

**Expression, Reinigung und strukturelle
Charakterisierung von Upd3, Aktivator des
Jak/Stat-Signalweges in *Drosophila***

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Jana Nowinski

geb. Kieper

Kiel, Januar 2013

Referent:	Prof. Dr. Joachim Grötzinger
Korreferent:	Prof. Dr. Thomas Roeder
Tag der mündlichen Prüfung:	28.02.2013

Zusammenfassung

Der Jak/Stat-Signalweg kann in *Drosophila* von drei Unpaired (Upd)-Proteinen aktiviert werden. Während Upd und Upd2 wichtig für die embryonale Entwicklung sind, spielt Upd3 eine Rolle bei der Immunantwort und der Darm-Homöostase (Agaisse, Petersen et al. 2003). Aufgrund seiner Funktion in der Immunantwort und seiner potentiellen Orthologie zu IL-6 der Vertebraten, wurde der Schwerpunkt in dieser Arbeit auf Upd3 gelegt.

Während Upd und Upd2 Signalsequenzen besitzen und sekretiert werden, konnte bei Upd3 keine Signalsequenz identifiziert werden. Mittels Durchflusszytometrie konnte Upd3 an der Oberfläche von transfizierten HEK-293T- und S2-Zellen nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte mit dieser Methode der N-terminale Teil von Upd3 ausschließlich im Inneren der Zellen nachgewiesen werden. Außerdem konnte Upd3 nicht durch einen hohen pH-Wert von isolierten Membranen gelöst werden, was eine Assoziation von Upd3 mit der Membran ausschließt. Diese Untersuchungen lieferten Hinweise darauf, dass Upd3 ein Typ-II-Transmembranprotein sein könnte. Ob Upd3 von der Membran gespalten wird, ist jedoch unklar.

Über die Struktur der Unpaired-Proteine ist außer Vorhersagen noch nichts bekannt. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Schwerpunkt auf die Reinigung und strukturelle Charakterisierung von rekombinantem Upd3 gelegt. Bei der Klonierung des Upd3-Konstrukts wurde auf die mögliche Signalsequenz bzw. den intrazellulären Bereich und den Transmembranbereich verzichtet. Es konnte gezeigt werden, dass der restliche Teil des Proteins bzw. der vermutete extrazelluläre Bereich genügt, um den Jak/Stat-Signalweg zu aktivieren. Für die Produktion von Antikörpern wurde mit Thioredoxin markiertes Upd3 (Trx-Upd3) verwendet. Die Reinigung von rekombinantem Protein für die Strukturaufklärung erfolgte mit einem Konstrukt ohne Thioredoxin-tag (His-Upd3). Mittels Zirkulardichroismus wurde gezeigt, dass der vermutlich extrazelluläre Teil von Upd3, wie erwartet, α -helikale Strukturen aufweist. Analysen von proteolytisch generierten Peptiden des gereinigten His-Upd3 mittels Massenspektrometrie ergaben, dass Cys¹²⁹ und Cys³⁸⁷ durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind, Cys¹⁴⁶ und Cys²⁷¹ hingegen in ihrer reduzierten Form vorliegen. Für das rekombinante His-Upd3 konnte ein Reinigungsprotokoll etabliert werden. Ein erstes NMR-Spektrum konnte anschließend von ¹³C und ¹⁵N Isotopen markiertem His-Upd3 für die Strukturaufklärung generiert werden. Für eine endgültige Strukturaufklärung müssen jedoch, auf Grund der Größe des Proteins, Aminosäure-spezifische Markierungen vorgenommen werden.

Summary

The Jak/Stat pathway in *Drosophila* is activated by three Unpaired (Upd) proteins. Whereas Upd and Upd2 are important for embryonic development, Upd3 has been shown to play a role in gut homeostasis and immune response (Agaisse, Petersen et al. 2003). Due to the role in immune response and its potential orthology to IL-6, our work was focused on Upd3.

Whereas Upd and Upd2 contain a signal sequence and are secreted proteins, Upd3 is lacking a typical signal sequence. Upd3 was detected on the cell surface of transfected HEK-293T and S2 cells via flow cytometry. Furthermore, Upd3 was not released from isolated membranes after several washing steps at high pH. These observations gave hints that Upd3 could be a type-II-transmembrane protein. However, it is still unclear, if Upd3 is cleaved off from the membrane by a protease.

Up to now, the structure of the unpaired proteins has not been revealed. Therefore we aimed to purify and structurally characterize the recombinant Upd3. The cloned Upd3 construct lacked the possible signal sequence or the predicted intracellular region and transmembrane region. This construct, containing the extracellular part of Upd3, was able to activate the Jak/Stat pathway. For the production of antibodies against Upd3, a fusion protein composed of thioredoxin, a His-tag and the extracellular part of Upd3 was used. An Upd3 construct without thioredoxin-tag was generated for structural characterization (His-Upd3). Measurements of the circular dichroism showed that the predicted extracellular part of Upd3 consisted of α -helices. Proteolytic peptide analysis and mass spectrometry predicted the existence of a disulfide bond between Cys¹²⁹ and Cys³⁸⁷, while Cys¹⁴⁶ and Cys²⁷¹ were reduced. With the help of recombinant His-Upd3, a purification protocol was established and first NMR spectra of ¹³C- and ¹⁵N-isotope labeled Upd3 were acquired. For final structural characterization amino-acid specific labeling has to be performed, due to the large size of Upd3.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary.....	II
1 Einleitung.....	1
1.1 Jak/Stat-Signalweg.....	1
1.2 Jak/Stat-Signalweg in Vertebraten	1
1.3 Jak/Stat-Signalweg in <i>Drosophila</i>	2
1.4 Unpaired Proteine	3
1.5 Upd3	3
1.6 Immunsystem in <i>Drosophila</i>	4
1.7 Signalsequenzen	5
1.8 Membranproteine	5
1.9 Zielsetzung dieser Arbeit	6
2 Materialien und Methoden	7
2.1 Materialien	7
2.1.1 Antikörper.....	7
2.1.2 Chemikalien	8
2.1.3 Enzyme	8
2.1.4 Geräte.....	9
2.1.5 Komplettsysteme.....	10
2.1.6 Größenstandards.....	10
2.1.7 DNA.....	10
2.1.8 Verbrauchsmaterialien	12
2.1.9 Zellkultur.....	13
2.1.10 Zelllinien	14
2.2 Methoden.....	15
2.2.1 Gelelektrophorese	15
2.2.2 Arbeiten mit Bakterien	16
2.2.3 Klonierung	18
2.2.4 Proteinreinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie	20
2.2.5 Methoden für die Untersuchung der Proteinstruktur	21
2.2.6 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen	22
2.2.7 Produktion und Reinigung der Antikörper	24

2.2.8	Membranpräparation.....	24
2.2.9	Durchflusszytometrie	25
2.2.10	Luciferase-Test.....	27
2.2.11	Western-Blot	27
3	Ergebnisse	29
3.1	Strukturvorhersagen über Upd3	29
3.1.1	Signalpeptidvorhersage.....	29
3.1.2	Sekundärstrukturvorhersage.....	30
3.2	Oberflächenexpression von Upd3	30
3.2.1	Durchflusszytometrie	31
3.2.2	Membranisolierung	34
3.3	Charakterisierung des rekombinanten Upd3	36
3.3.1	Reinigung des N-terminal Trx-markierten Upd3	36
3.3.2	Monoklonale Antikörper gegen Upd3.....	44
3.3.3	Reinigung des Upd3 mit N-terminalem His- <i>tag</i>	47
3.3.4	Luciferase-Test.....	49
3.3.5	Untersuchungen zur Struktur von His-Upd3	51
4	Diskussion	57
4.1	Strukturelle Charakterisierung von Upd3.....	57
4.2	Funktionelle und Strukturelle Charakterisierung des rekombinanten Upd3.....	61
4.2.1	Herstellung des Trx-Upd3 für die Antikörperproduktion	61
4.2.2	Luciferase-Test.....	62
4.2.3	Strukturelle Charakterisierung des His-Upd3.....	63
5	Aussichten.....	66
6	Literatur	68
7	Anhang.....	71
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	71
7.2	Aminosäuren	73
7.3	DNA für das rekombinante Upd3	74

1 Einleitung

1.1 Jak/Stat-Signalweg

Der *janus-kinase/signal transducer and activator* (Jak/Stat)-Signalweg wurde erstmals in Säugetieren entdeckt (Darnell, Kerr et al. 1994; Schindler and Darnell 1995). Erst zu einem späteren Zeitpunkt wurde diese Signalkaskade auch in den Invertebraten beschrieben (Dearolf 1999). So ist der Jak/Stat-Signalweg in Schleimpilzen, Würmern, Fliegen und Vertebraten, jedoch nicht in Pilzen und Pflanzen vertreten. Während in Vertebraten eine Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren variierende Jaks und Stats aktivieren, sind diese Komponenten in den Invertebraten reduziert. In dieser Arbeit wurde Upd3, ein Zytokin welches die Jak/Stat-Signalkaskade in der Taufliege (*Drosophila melanogaster*) aktiviert, untersucht.

1.2 Jak/Stat-Signalweg in Vertebraten

Bei Vertebraten wird der Jak/Stat-Signalweg durch eine Vielzahl von Interferonen, Wachstumsfaktoren oder Interleukinen aktiviert. Dazu gehört die Interleukin (IL)-6 Zytokin-Familie. Diese Zytokine gehören zu den vier-Helix-Bündel Zytokinen (Grötzinger, Kernebeck et al. 1999). Rezeptoren der IL-6 Zytokin-Familie, wie Glykoprotein 130 (gp130) und *leukemia inhibitory factor receptor* (LIFR) zeigen entsprechende Homologien zu dem Rezeptor Domeless des Signalweges von *Drosophila* (Brown, Hu et al. 2001; Chen, Chen et al. 2002; Makki, Meister et al. 2010). Um näher auf die Funktion des Signalweges in der Immunantwort und Entzündungsreaktion einzugehen, soll im Folgenden IL-6 sowie die Aktivierung des Jak/Stat-Signalweges durch dieses Zytokin genauer beschrieben werden. Neben seiner Funktion in der Immunantwort (Andus, Geiger et al. 1987; Gauldie, Richards et al. 1987) und in Entzündungsreaktionen (Mackiewicz, Schooltink et al. 1992), ist IL-6 auch in der Proliferation und Differenzierung von Lymphozyten (Okada, Sakaguchi et al. 1983; Kishimoto, Akira et al. 1995) und dem Wachstum von Myelom- und Plasmazytomzellen involviert (Van Damme, Opdenakker et al. 1987; Kawano, Hirano et al. 1988). Die Aktivierung des Jak/Stat-Signalweges, vermittelt durch IL-6, benötigt zwei Arten von Rezeptoren: den nicht signalgebenden IL-6 Rezeptor α (IL-6R α) und den signalübertragenden Rezeptor gp130 (Heinrich, Behrmann et al. 2003). Gp130 ist auf nahezu allen Zellen zu finden, wohingegen der IL-6R α nur von Hepatozyten und einigen Leukozyten exprimiert wird (Rose-John, Scheller et al. 2006; Scheller and Rose-John 2006). Für die IL-6-Signalwirkung ist zunächst die Bindung des Zytokins an seinen Rezeptor

erforderlich. Erst dann kann der IL-6/IL-6R α Komplex mit zwei gp130 Molekülen interagieren. Auf diesen Vorgang folgt die Aktivierung von Januskinasen (Jak), welche daraufhin die Rezeptoren und Stat3-Moleküle phosphorylieren. Dadurch dimerisieren die Transkriptionsfaktoren und wandern in den Zellkern um ihre Aktivität zu entfalten.

1.3 Jak/Stat-Signalweg in *Drosophila*

Zwar wurde zunächst der Jak/Stat-Signalweg der Säuger beschrieben, nach seiner Entdeckung in der Fruchtfliege wurde er jedoch auch dort intensiv analysiert, da in dem Modelorganismus *Drosophila* schnell und unkompliziert *gain* und *loss of function* Mutanten generiert werden können. Darüber hinaus existieren hierfür hochentwickelte genetische und molekulare Werkzeuge sowie eine Vielzahl an Markern. Des Weiteren ist die Anzahl der Komponenten des Signalweges im Vergleich zu Säugern stark reduziert.

So kommt in dem *Drosophila*-Genom ein einziges Stat-Homologon mit dem Namen *stat92E* (Hou, Melnick et al. 1996), ein Januskinasen-Homologon namens *hopscotch* (*hop*) (Binari and Perrimon 1994) und ein Rezeptor mit dem Namen *domeless* (*dome*) vor (Brown, Hu et al. 2001; Ghiglione, Devergne et al. 2002), welcher auch als *mother of marelle* (*mom*) bezeichnet wird (Chen, Chen et al. 2002). Während in den Vertebraten zahlreiche Interferone und Interleukine den Jak/Stat-Signalweg aktivieren, gibt es in *Drosophila* nur drei Zytokin-ähnliche Proteine die dazu in der Lage sind: Unpaired (Upd) (Harrison, McCoon et al. 1998), Upd2 (Hombria, Brown et al. 2005) und Upd3 (Agaisse, Petersen et al. 2003). Diese Upd-Proteine wurden bisher ausschließlich in *Drosophila* nachgewiesen (Wright, Vogt et al. 2011). Die Aktivierung des Rezeptors Domeless durch eines der Upd-Proteine aktiviert die Hopscotch-Kinasen, welche wiederum Stats aktivieren. Die Stats dimerisieren, wandern in den Zellkern und agieren dort als Transkriptionsfaktor (Abbildung 1). In der Taufliede spielt der Jak/Stat-Signalweg bei zahlreichen Vorgängen eine wichtige Rolle, wie zum Beispiel in der Hämatopoese (Harrison, Binari et al. 1995), in der Entwicklung des Auges (Zeidler, Perrimon et al. 1999), in der Segmentierung (Zeidler, Bach et al. 2000), in der Stammzellerhaltung (Kiger, Jones et al. 2001), in der angeborenen Immunantwort (Agaisse, Petersen et al. 2003) und in der Zellproliferation (Mukherjee, Hombria et al. 2005).

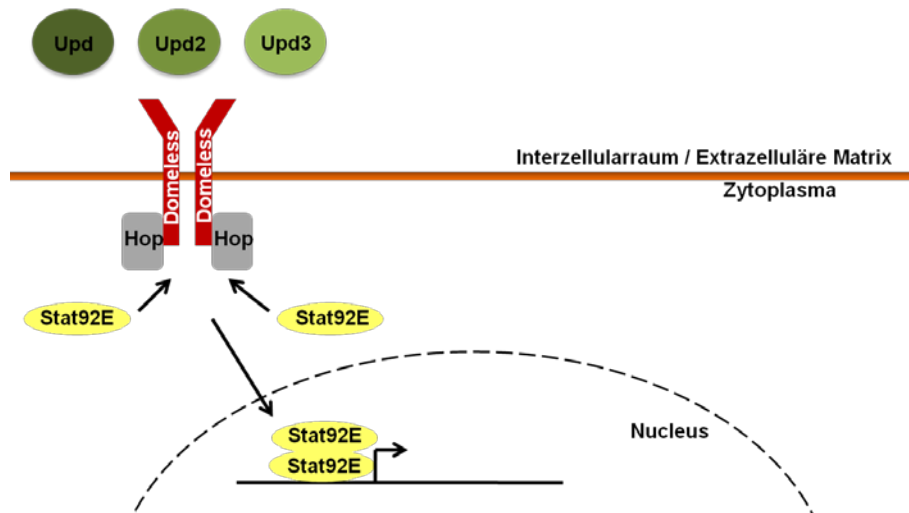


Abbildung 1: Jak/Stat-Signalweg in *Drosophila melanogaster*. Die drei Liganden Upd, Upd2 und Upd3 sind in der Lage den Rezeptor Domeless zu aktivieren. Die Januskinase Hopscotch (Hop) wird aktiviert und phosphoryliert Stat92E Moleküle, diese fungieren im Zellkern als Transkriptionsfaktor.

1.4 Unpaired Proteine

Das *unpaired* Gen, auch *outstreched* genannt, wurde durch Mutanten identifiziert welche Fehler in der Segmentation aufwiesen. Unpaired (Upd) ist ein glykosyliertes, sekretiertes Protein, welches stark mit der extrazellulären Matrix assoziiert ist und den Jak/Stat-Signalweg bei *Drosophila* aktiviert (Harrison, McCoon et al. 1998; Hombria, Brown et al. 2005). Die Vermutung, dass Upd in den Jak/Stat-Signalweg involviert ist, entstand als *loss of function* Mutanten von Upd ähnliche Phänotypen in der Segmentierung der Embryonen aufwiesen wie die Hop und Stat92E Mutanten (Harrison, McCoon et al. 1998). Im Anschluss an die Entdeckung der Funktion von Upd wurden zwei weitere homologe Proteine entdeckt: die Unpaired ähnlichen Proteine Upd2 und Upd3. Genau wie Upd ist Upd2 ein sekretorisches Protein, allerdings ist es weniger stark mit der extrazellulären Matrix assoziiert (Hombria, Brown et al. 2005). Während Upd und Upd2 wichtig in der embryonale Entwicklung sind (Harrison, McCoon et al. 1998; Zeidler, Bach et al. 2000; Hombria, Brown et al. 2005), spielt Upd3 eine Rolle bei der Darm-Homöostase und der Immunantwort (Agaisse, Petersen et al. 2003; Jiang, Patel et al. 2009).

1.5 Upd3

Aufgrund der Funktion von Upd3 in der Immunantwort, wurde in dieser Arbeit dieses Upd-ähnliche Zytokin fokussiert. Upd3 wird in Hämozyten und in Darmzellen als Antwort auf eine bakterielle Infektion exprimiert (Agaisse, Petersen et al. 2003; Buchon, Broderick et al. 2009). Der durch Upd3 aktivierte Jak/Stat-Signalweg reguliert unter anderem die Expression

des Gens *totA* hoch. Für eine Transkription von *totA* wird jedoch eine zusätzliche Aktivierung des Relish-Signalweges im Fettkörperchen benötigt. TotA ist ein Akute-Phasen-Protein und wirkt als regulierender Faktor bei der Stressantwort (Agaisse, Petersen et al. 2003). Wie Upd3 aktiviert auch IL-6 die Akute-Phase-Antwort, womit die Orthologie zwischen IL-6 und Upd3 aufgrund ihrer ähnlichen Funktion bestärkt wird. Upd3 ist mit 401 Aminosäuren das kleinste der drei unpaired-Proteine und besitzt sieben potentielle N-Glykosylierungsstellen (Wright, Vogt et al. 2011).

1.6 Immunsystem in *Drosophila*

Die Fruchtfliege besitzt im Gegensatz zu den Vertebraten nur ein angeborenes Immunsystem, welches sich in Zell-vermitteltes und humoral-vermitteltes Immunsystem unterteilt (Hoffmann 1995). Eine wichtige Rolle spielt dabei das Fettkörperchen, welches als Analogon zur Leber der Säugetiere angesehen werden kann. In den Zellen des Fettkörperchens werden als Antwort auf Infektionen durch Pilze oder Bakterien antimikrobielle Peptide (AMPs) produziert (Bulet, Hetru et al. 1999). Zudem spielen die Hämocyten eine Rolle beim angeborenen Immunsystem von *Drosophila melanogaster*. Neben der Zytokinproduktion können Hämocyten Bakterien oder Pilze durch Phagozytose aufnehmen und zerstören (Zell-vermitteltes Immunsystem).

Neben dem Jak/Stat-Signalweg ist die Spätzle-Toll-Signalkaskade für ein intaktes Immunsystem in der Taufliege erforderlich. Spätzle wird in den Hämocyten gebildet und in die Hämolymphe abgegeben. Über die Hämolymphe gelangt das Zytokin zu den Fettkörperzellen, bindet dort an den Toll-Rezeptor und aktiviert dadurch eine entsprechende Signalkaskade. Dieser Prozess endet mit der Expression und Sekretion von AMPs, wie z.B. Drosomycin. Diese Faktoren werden schließlich in die Hämolymphe abgegeben (Ferrandon, Imler et al. 2004). Neben dem Toll-Signalweg führt der *immune deficiency* (IMD) Signalweg, der sich ebenfalls in den Zellen des Fettkörpers abspielt, ebenfalls zur Expression und Sekretion von AMPs (Lemaitre, Nicolas et al. 1996). Der Toll-Signalweg ist zu dem IL-1 Rezeptor-Signalweg und dem Toll-like Rezeptor-Signalweg in Säugern analog. Die IMD-Signalkaskade hingegen kann mit dem Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) der Säuger verglichen werden. Die Identifizierung der Toll-like- und TNF- α -Signalwege in den Säugern gelang durch die Untersuchung der Toll- und IMD-Signalkaskaden in *Drosophila* (Hoffmann 2003). Der dritte Signalweg in der Abwehrreaktion der Taufliege ist der Jak/Stat-Signalweg, der durch Upd3 aktiviert wird. Upd3 wird als Antwort auf eine Wundinfektion in Hämocyten produziert und in die Hämolymphe abgegeben. Upd3 aktiviert im Fettkörperchen die Jak/Stat-Signalkaskade, wodurch die Expression und Sekretion des Akute-Phase-Proteins TotA aktiviert wird (Agaisse, Petersen et al. 2003).

1.7 Signalsequenzen

Proteine, die aufgrund ihres Bestimmungsortes Membranen durchspannen müssen, besitzen in den meisten Fällen Signalsequenzen. Sie werden nach ihrer Synthese über das Endoplasmatische Retikulum (ER) in unterschiedliche Zellkompartimente oder in die Zellmembran transportiert oder aus der Zelle ausgeschleust. Für diese gerichteten Transportprozesse ist die Signalsequenz verantwortlich. Bei einer Signalsequenz, auch Signalpeptid genannt, handelt es sich um eine kurze Aminosäuresequenz, welche als Erkennungssequenz fungiert (Blobel and Dobberstein 1975). Dabei ist die Primärstruktur von Signalsequenzen sekretorischer Proteine und integraler Membranproteine nicht konserviert. Grundsätzlich besitzen solche Signalpeptide jedoch einen zentralen hydrophoben Kern, an den N-terminal positiv geladene und C-terminal polare Aminosäuren (AS) angrenzen. Die Länge dieser Peptidketten variiert sehr, die meisten bestehen aus 15-30 AS (von Heijne 1985; Martoglio and Dobberstein 1998). In *Drosophila* wurde sogar ein Signalpeptid mit einer Länge von 85 AS beschrieben (Kilic, Klose et al. 2010). Signalsequenzen werden nach der Synthese des Proteins von einer Signalpeptidase abgespalten und komplett abgebaut (Dalbey and Von Heijne 1992). Typ-II-Transmembranproteine besitzen hingegen kein Signalpeptid. Hier übernimmt die Transmembrandomäne die Funktion der Signalsequenz. Diese Sequenz, auch Ankersequenz genannt, zeichnet sich durch einen ca. 20 Aminosäure langen hydrophoben Kernbereich und fehlender Signalpeptidase-Schnittstellen aus (von Heijne 1985; Martoglio and Dobberstein 1998).

1.8 Membranproteine

Membranproteine durchspannen entweder die Lipiddoppelschicht der Zellmembran vollständig (Transmembranproteine), besitzen einen Lipidanker, sind in einer der beiden Lipidschichten eingelagert oder sie durchdringen die Membran nicht, sondern sind über nichtkovalente Ionenbindungen und Wasserstoffbrücken an die Lipide oder an integrale Proteine gebunden (periphere Proteine) (Capaldi and Green 1972). Transmembranproteine können die Lipiddoppelschicht einmal (Einspanner) oder mehrmals (Mehrspanner) durchqueren. Die Einspanner unterteilen sich in Typ-I-Transmembranproteine, bei denen sich der C-Terminus auf der zytosolischen Seite der Zelle befindet, und die zuvor erwähnten Typ-II-Transmembranproteine, mit extrazellulärem C-Terminus. Typ-I-Transmembranproteine besitzen eine Signalsequenz, die abgespalten wird, sowie eine Stop-Transfersequenz, welche als Membrananker wirkt. Bei den Typ-II-Transmembranproteinen hingegen wirkt die Stop-Transfersequenz als Signalsequenz und wird nicht abgespalten (Wahlberg and Spiess 1997; Martoglio and Dobberstein 1998; Almen, Nordstrom et al. 2009). Die Vorhersagen von Transmembranproteinen basieren auf Ladungsausrichtungs-

und Hydrophobizitätsanalysen (Krogh, Larsson et al. 2001). Der transmembrane Bereich des Proteins bildet meist eine hydrophobe Helix (Argos, Rao et al. 1982). Der zytoplasmatische Teil der Sequenz besteht überwiegend aus positiv geladenen Aminosäureresten (Heijne 1986; von Heijne 1992). Lipidverankerte Proteine sind auf der zytosolischen Seite der Membran hauptsächlich durch Prenyl-, Palmytoyl- oder Myristoylreste und auf der extrazellulären Seite über Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker in der jeweiligen Lipidschicht eingelagert (Low and Saltiel 1988; Lu and Hofmann 2006).

1.9 Zielsetzung dieser Arbeit

Der Jak/Stat-Signalweg bei *Drosophila* kann durch die drei Zytokin-ähnlichen Proteine Upd, Upd2 und Upd3 aktiviert werden. Während Upd und Upd2 für die embryonale Entwicklung wichtig sind, spielt Upd3, ähnlich wie die IL-6-Zytokin-Familie der Vertebraten, eine Rolle bei der Immunantwort (Agaisse, Petersen et al. 2003). Der Rezeptor des Jak/Stat-Signalweges in *Drosophila* (Domeless) ist mit den IL-6-Familie-Rezeptoren der Vertebraten verwandt (Brown, Hu et al. 2001; Chen, Chen et al. 2002; Makki, Meister et al. 2010). Eine mögliche Verwandtschaft zwischen Upd3 und den IL-6-Familie-Zytokinen war, aufgrund der übereinstimmenden Funktion, von besonderem Interesse. Das Ziel dieser Arbeit war Upd3 als mögliches Analogon zu IL-6 strukturell und funktionell zu charakterisieren.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte besonders auf die Struktur und die Lokalisierung von Upd3 im Bezug auf die Zelle eingegangen werden. Mittels verschiedener Programme sollten Vorhersagen über die Sekundärstruktur von Upd3 erhalten werden, um so einerseits Hinweise auf mögliche strukturelle Ähnlichkeiten zu IL-6 und andererseits Informationen über eine mögliche Signalsequenz zu erhalten. Dies sollte Aufschluss darüber geben, ob Upd3 ein sekretorisches Protein oder ein Typ-II-Transmembranprotein ist. Diese Fragestellung sollte mithilfe der Durchflusszytometrie und Membranpräparation untersucht werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die Struktur von Upd3 im Mittelpunkt stehen. Dafür sollte Upd3 als rekombinantes Protein exprimiert und gereinigt werden. Hierbei war von Interesse, ob der verwendete Bereich ohne Signalpeptid bzw. Transmembransegment und zytoplasmatischer Abschnitt ausreichend ist um den Jak/Stat-Signalweg zu aktivieren. Anschließend sollten erste Untersuchungen bezüglich der Struktur von Upd3 erfolgen.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Antikörper

2.1.1.1 Primäre Antikörper

α -Upd3	Maus anti-Upd3 IgG (U31-4 und U31-7) (Eigenherstellung)
α -His	Maus anti-His- <i>tag</i> IgG (27E8) (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland)
α -GFP	Maus anti-GFP IgG (7.1 und 13.1) (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)
α -HA	Kaninchen anti-HA- <i>tag</i> IgG (C29F4) (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland)

2.1.1.2 Sekundäre Antikörper

α -mouse-POD	Peroxidase gekoppelter Ziege anti-Maus IgG (Thermo Fisher Scientific, p/a Perbio Science, Bonn, Deutschland)
α -rabbit-POD	Peroxidase gekoppelter Ziege anti-Hase IgG (Thermo Fisher Scientific, p/a Perbio Science, Bonn, Deutschland)
α -rabbit-PE	R-Phycoerythrin F(ab') ₂ Fragment Ziege anti-Hase IgG (Invitrogen/Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland)
α -mouse-APC	Allophycocyanin F(ab') ₂ Fragment Ziege anti-Maus IgG (Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland)

2.1.2 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Applichem (Darmstadt, Deutschland) oder Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen und entsprachen der europäischen Reinheitsnorm.

2.1.3 Enzyme

Klonierung	Bgl II (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland)
	FastAP Alkaline Phosphatase (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland)
	Go Taq DNA-Polymerase (Promega, Mannheim, Deutschland)
	Nde I (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland)
	Not I (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland)
	Pfu DNA-Polymerase (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland)
	T4 DNA-Ligase (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland)
	Xho I (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland)
Proteinreinigung	Benzonase (Novagen/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
	EKMax Enterokinase (Invitrogen/Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland)

2.1.4 Geräte

Äkta	FPLC (GE Healthcare, München, Deutschland)
	Purifier (GE Healthcare, München, Deutschland)
Chromatografie-Säulen	His Trap 1 ml (GE Healthcare, München, Deutschland)
	Superdex 75 16/60 (GE Healthcare, München, Deutschland)
Durchflusszytometrie	FACS Canto mit FACS Diva Software (BD GmbH, Heidelberg, Deutschland)
Konzentratoren	Amicon stirred ultrafiltration cell 8050/8400 (Merck/Millipore, Darmstadt, Deutschland)
Lyophylle	Alpha 2-4 LSC (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen, Osterode, Deutschland)
Luminometer	GLOMAX-96 Microplate (Promega, Mannheim, Deutschland)
Sonifikator	Sonopuls UW2200, SH2133, Titanteller TT13 (Bandelin, Berlin, Deutschland)
	Sonifier 450, Becher-Resonator (Branson/G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd, Deutschland)
Spektrophotometer	Nano Drop ND1000 (peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland)
	U-2001 (Hitachi Europe GmbH, Düsseldorf, Deutschland)
Thermocycler	Personal Cycler (Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland)
Western Blot Detektion	Fluorochem Q, Multiimage III (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland)

Las1000 (FUJIFILM Europe GmbH, Düsseldorf, Deutschland)

2.1.5 Komplettsysteme

Klonierung	NucleoBond PC 500 (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega, Mannheim, Deutschland) PCR clean up (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland)
Western Blot	20x LumiGlo Reagent and 20x Peroxide (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland) ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare, München, Deutschland)
Luciferase-Assay	Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega, Mannheim, Deutschland)

2.1.6 Größenstandards

Agarosegel	Gene Ruler 1 kb DNA Ladder (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland)
SDS-PAGE	Prestained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland)

2.1.7 DNA

2.1.7.1 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden bei Metabion (Planegg-Martinsried, Deutschland) bestellt und sind in der Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Oligonukleotide welche als Primer zur Klonierung von Upd3 verwendet wurden.

Name	Sequenz 5'-3'
pET28-Upd3-kurz-fwd	GGAATTCCATATGACCAATCCGCTGAAACATCTGCAGAAACG
pET28-Upd3-rev	ATAGTTTAGCGGCCGCATTATTACAGTTTTTTCTGAATGGCTTTCGGAACATGGG
pET32-Upd3-fwd	GAAGATCTGATGATGATGATAAAGGTGTTAGCGC
pET32-Upd3-rev	GCTCCTCGAGTTATTACAGTTTTTTCTGAATGGC

2.1.7.2 Vektoren

pAC5-Upd3-GFP	Vektor für Insektenzellen mit Upd3 (Zoologisches Institut, CAU Kiel)
pAC5-HA-Upd3	Vektor für Insektenzellen mit Upd3 (Zoologisches Institut, CAU Kiel)
pAC5-Upd3	Vektor für Insektenzellen mit Upd3 (Zoologisches Institut, CAU Kiel)
pEAK-Upd3	Vektor für Säugerzellen mit Upd3 (Zoologisches Institut, CAU Kiel)
pEAK-HA-Upd3-GFP	Vektor für Säugerzellen mit Upd3 (Zoologisches Institut, CAU Kiel)
pET28a	Vektor für die Expression von Upd3 in prokaryotischen Zellen (Novagen/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
pET32a	Vektor für die Expression von Upd3 in prokaryotischen Zellen (Novagen/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
Act- <i>Renilla</i>	pCaSpeR-act-Vektor mit <i>Renilla</i> -Luciferase-Sequenz aus <i>Renilla reniformis</i> für den Luciferase-Assay in Kc 167 Zellen

(Department of Genetics, Harvard Medical School, Boston, USA)

10xSTAT92E-luciferase pUAST Vektor mit Firefly-Luciferase-Sequenz aus *Photinus pyralis* für den Luciferase-Test in Kc 167 Zellen (Baeg, Zhou et al. 2005) (Department of Genetics, Harvard Medical School, Boston, USA)

2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Filtration von Puffern Cellulosenitratfilter 1.2 µm (Sartorius Stedim, Göttingen, Deutschland)

Filtration von Proben Filtropur Filter 0.2 µm (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

Ultrafree Zentrifugierfilter (Millipore, Schwalbach, Deutschland)

Western Blot Gel-Blotting-Papier (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

PVDF Membran 0.45 µm (GE Healthcare, München, Deutschland)

Immobilon-P 0.45 µm (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Proteinreinigung Konzentratoren Vivaspin 2/20/500 10.000 MWCO (Sartorius Stedim, Göttingen, Deutschland)

Nap-5/10/25 Säulen (GE Healthcare, München, Deutschland)

Ni-NTA Agarose (Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland)

Sonstiges Plastikmaterialien (Sarstedt, Nümbrecht und Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland)

NMR-Röhrchen (Shigemi Inc., Allison Park, USA)

2.1.9 Zellkultur

Medium	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium, High Glucose</i> (DMEM) (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland)
	Hybridoma Express Plus (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland)
	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i> (RPMI) (Biochrom, Berlin, Deutschland)
	Schneider's <i>Drosophila</i> Medium (GENAXXON, Ulm, Deutschland)
Transfektion	Effectene Transfection Reagenz (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland)
	TurboFect (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland)
Zusätze für die Medien	<i>Fetal bovine serum</i> (FCS) (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland)
	L-Glutamin (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland)
	Natriumpyruvat (Gibco/Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland)
	Penicillin/Streptomycin (Pen./Strep.) (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland)
	β -Mercaptoethanol (Gibco/Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland)
Sonstiges	Trypsin/EDTA (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland)
	Dimethylsulfoxid (DMSO) (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

2.1.10 Zelllinien

HEK-293T	<i>human embryonic kidney cells</i>
S2	<i>Drosophila</i> Schneider 2 (S2)-Zellen, stammen von einer Primärkultur 20-24 h alter <i>Drosophila</i> -Embryonen ab
Kc 167	Stammen von 6-12 h alten Embryonen ab, Plasmacyten ähnliche Zellen (Cherbas, Willingham et al. 2011), <i>dorsal closure stage</i>
Hybridom-Zellen (U31-1, U31-4 und U31-7)	Zell-Linie entstanden durch die Fusion von B-Lymphozyten und Myelomzellen. Die B-Lymphozyten stammen aus der Milz einer Maus (Balb/c), die mit gereinigtem rekombinantem Trx-Upd3 immunisiert wurde. Die Myelomzellen X63-Ag8.653 sind maligne Plasmazellen, welche die Fähigkeit zur Immunglobulinproduktion verloren haben und HGPRTase defizient sind (Milstein 1999).

2.2 Methoden

2.2.1 Gelelektrophorese

2.2.1.1 Agarosegelelektrophorese

Zur Herstellung der Gele wurde 1 % Agarose in Elektrophoresepuffer (TBE) erhitzt bis sie gelöst war. Mit der 1 %igen Agarose-Lösung wurden 6 x 10 cm große Gele mit dem System von BioRad Laboratories GmbH (München, Deutschland) gegossen. Nach dem Aushärten der Gele wurden die Proben mit Agarose-Auftragspuffer (AAP) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Für die Trennung der DNA-Fragmente wurde 45 min lang eine Spannung von 100 V an die Gele angelegt. Anschließend wurden die Gele 30 min in einem Ethidiumbromidbad inkubiert. Die gefärbten Gele wurden mit Wasser gewaschen und unter UV-Licht bildlich festgehalten.

TBE (Tris/Borsäure/EDTA)

100 mM Tris

100 mM Borsäure

2.5 mM EDTA

10x Agarose-Auftragspuffer

500 mM EDTA

25 % Glycerin

2.4 % *sodium dodecyl sulfate* (SDS)

0.1 % Bromphenolblau

0.1 % Xylencyanol

2.2.1.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde zur Trennung von Proteinen, entsprechend ihrer Größe, verwendet. Für die Herstellung der Acrylamidgele wurde das System von Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland) verwendet. Dabei wurden die unten aufgeführten Gellösungen, sowie Glasplatten für Minigele mit 1 mm *spacer* (Bio-Rad) benutzt. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit Laemmli-Auftragspuffer (LAP) versehen und für 5 min bei 95 °C erhitzt. Nachdem die Proben auf das Gel

aufgetragen wurden, wurde für 50 - 80 min eine Spannung von 200 V angelegt. Die Proteinbanden wurden mittels Coomassie sichtbar gemacht oder via Western Blot detektiert.

5x Lämmli-Auftragspuffer (LAP)

160 mM Tris/HCl (pH 6.8)
4 % SDS
25 % β -Mercaptoethanol
40 % Glycerin
0.1 % Bromphenolblau

Sammelgel

7.5 % Acrylamid (37.5 : 1)
125 mM Tris (pH 6.8)
0.1 % SDS

Trenngel

15 % Acrylamid (37.5 : 1)	10 % Acrylamid (37.5 : 1)
375 mM Tris (pH 8.8)	375 mM Tris (pH 8.8)
0.1 % SDS	0.1 % SDS
0.1 % Ammoniumperoxodisulfat (APS)	0.1 % APS
0.1 % Tetramethylethyldiamin (TEMED)	0.1 % TEMED

2.2.2 Arbeiten mit Bakterien

Beim Kultivieren von Bakterien wurden die *E. coli*-Stämme BL21, BLR (Proteinexpression) und DH5 α (Plasmidpräparation) verwendet. Die Zellen wurden bei -80 °C gelagert und in *lysogeny broth*-(LB)-Medium oder auf LB-Agar-Platten bei 37 °C kultiviert.

2.2.2.1 Chemische Transformation

Ein Aliquot (100 μ l) chemisch kompetenter Zellen wurde auf Eis angetaut und mit 80 - 100 ng der gewünschten Plasmid-DNA versetzt. Das Zell-DNA-Gemisch wurde 20 min auf Eis, danach 30 s bei 42 °C und anschließend 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurden 400 μ l LB-Medium zugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen 1 min bei 3500 g zentrifugiert, der Überstand wurde entfernt, das Pellet in LB-Medium resuspendiert und anschließend auf einer LB-Agar-Platte mit entsprechendem Antibiotikum

(100 µg/ml Ampicillin, bzw. 30 µg/ml Kanamycin) ausplattiert. Die LB-Agar-Platten wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.2.2 Plasmidpräparation (Midi-/Maxi)

Je 100 ml (Midi) oder 250 ml (Maxi) LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin, bzw. 30 µg/ml Kanamycin) wurden mit einem Klon der Bakterien angeimpft, welches die gewünschte Plasmid-DNA enthält. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C und 160 rpm inkubiert und am nächsten Tag sedimentiert. Für eine Midi-Plasmidreinigung wurde das Kit von Promega und für eine Maxi-Plasmidreinigung wurde das Komplettsystem von Macherey und Nagel verwendet (siehe 2.1.5.).

2.2.2.3 Proteinexpression in Bakterien

300 ml LB-Medium (mit entsprechendem Antibiotikum) wurden mit 4 ml Vorkultur inokuliert und in einem Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert. Nachdem eine OD₆₀₀ von 0.5 - 0.8 erreicht war, wurde IPTG (0.3 mM Endkonzentration) dazugegeben um eine Protein-Überexpression einzuleiten. Die Proteinexpression erfolgte für 3 h bei 37 °C und 160 rpm. Anschließend wurden die Bakterien bei 4000 g und 4°C für 10 min zentrifugiert und entweder direkt durch sonifizieren lysiert oder bei -20 °C gelagert.

2.2.2.4 Markierung von Proteinen mit ¹³C- und ¹⁵N-Isotopen

Für die Strukturanalyse mittels der Kernspin-Resonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) wurde das Protein mit ¹³C- und ¹⁵N-Isotopen markiert. Dies erfolgte durch die Expression des Proteins in Minimal-Medium. In diesem Medium befand sich zusätzlich zu den anderen Komponenten, wie Dinatriumhydrogenphosphat, Kaliumhydrogenphosphat, Natriumchlorid und Magnesiumsulfat, Stickstoff- und Kohlenstoffatome ausschließlich in Form von ¹³C-Glucose und ¹⁵N-Ammoniumchlorid. Diese Atome wurden bei der Proteinexpression in die Aminosäuren eingebaut. Die Expression erfolgte entsprechend der Expression im LB-Medium.

Minimalmedium

45 mM Na₂HPO₄

22 mM KH₂PO₄

17 mM NaCl

2 mM MgSO₄

10 mM ¹³C Glucose

15 mM ¹⁵NH₄Cl

2.2.3 Klonierung

2.2.3.1 Upd3 mit Thioredoxin-tag und His-tag (Trx-Upd3)

Für die Herstellung von rekombinantem Upd3 mit einem N-terminalen Thioredoxin-tag wurde die DNA-Sequenz ohne das vorhergesagte Signalpeptid Codon optimiert und in den Vektor pET32a kloniert. Dabei wurden der *forward*- „pET32-Upd3-fwd“ und der *reverse*-Primer „pET32-Upd3-rev“ (Tabelle 1) verwendet. Der Restriktionsverdau erfolgte mit den Enzymen Not I und Bgl II (Abbildung 2 A).

2.2.3.2 Upd3 mit His-tag (His-Upd3)

Die Klonierung von rekombinantem Upd3 mit einem N-terminalen His-tag erfolgte mit der DNA-Sequenz ab der Aminosäure 93 und dem Vektor pET28a. Dabei wurden der *forward*- „pET28-Upd3-kurz-fwd“ und der *reverse*-Primer „pET28-Upd3-rev“ (Tabelle 1) verwendet. Für den Restriktionsverdau wurden die Enzyme Xho I und Nde I eingesetzt (Abbildung 2 B).

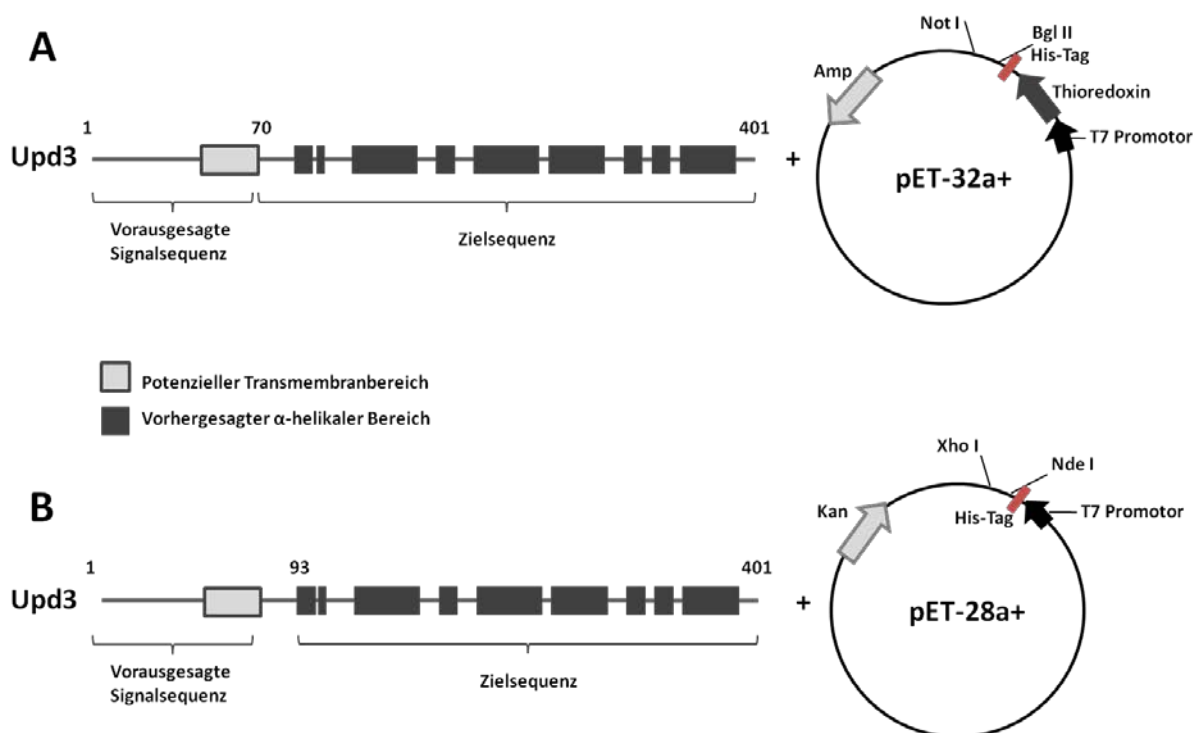


Abbildung 2: Klonierungsstrategie für Trx-Upd3 und His-Upd3. A) Für Trx-Upd3 wurde die Sequenz von Upd3 ab der Aminosäure (AS) 70 bis zur AS 401 in den Vektor pET32a zwischen die Restriktionsschnittstellen von Not I und Bgl II kloniert. Der Vektor pET32a besitzt unter anderem ein Resistenzgen gegen Ampicillin, einen His-tag, einen Thioredoxin-tag und eine T7-Promotor-Sequenz. B) In den Vektor pET28a wurde die Sequenz von Upd3 ab der Aminosäure 93 bis 401 kloniert. pET28a besitzt ein Resistenzgen gegen Kanamycin, die Restriktionsschnittstellen von Xho I und Nde I, zwischen die Upd3 kloniert wurde, einen His-tag und die T7-Promotor-Sequenz.

2.2.3.3 Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente

Bei der Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente wurde die *Pfu*-DNA-Polymerase verwendet, da sie DNA-Amplifikate mit einer geringen Fehlerrate liefert. Die Polymerasekettenreaktions (PCR) -Ansätze wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt und enthielten neben 0.5 µM *forward* und 0.5 µM *reverse* Primer, 1 x Puffer für *Pfu*-DNA-Polymerase, 20-40 ng Template, 800 µM dNTPs, Wasser und 2.5 U *Pfu*-Polymerase.

PCR-Programm:

Denaturierung: 30 s bei 98 °C

(28 Zyklen)	Denaturierung:	10 s bei 98 °C
	Annealing:	20 s bei 54 °C
	Elongation:	90 s bei 72 °C

Elongation: 5 min bei 72 °C

2.2.3.4 Kolonie-PCR-Screen

Da bei einer Kolonie-PCR eher quantitative statt qualitative Produkte benötigt werden, wurde die Taq-DNA-Polymerase verwendet. Ein Klon wurde von einer Agarplatte gepickt, ein Teil auf einer zweiten Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum (30 µg/ml Kanamycin bzw. 100 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen und der Rest in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß mit 50 µl Wasser überführt („Kolonie-Mix“). Die Zellen wurden zum Aufbrechen der Membran 5 min bei 95 °C erhitzt. Von dem "Kolonie-Mix" wurden anschließend 25 µl zu 25 µl PCR-Mix (0.5 µM *forward*- und 0.5 µM *reverse*-Primer, 800 µM dNTPs, 1 x Taq-Puffer, 5 U Taq-Polymerase, Wasser) gegeben.

PCR-Programm:

Denaturierung: 3 min bei 95 °C

(25 Zyklen)	Denaturierung:	30 sec bei 95 °C
	Annealing:	30 sec bei 55 °C
	Elongation:	60 sec bei 72 °C

Elongation: 5 min bei 72 °C

2.2.3.5 Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurden 30 µl Plasmidlösung mit einer Konzentration von 30 - 100 µg/µl zu GATC Biotech AG (Köln, Deutschland) geschickt. Die Auswertung erfolgte mit dem Program DNAMAN (Lynnon Corporation, Kanada).

2.2.4 Proteinreinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie

2.2.4.1 Reinigung unlöslicher Proteine

Nachdem die Zellen bei 4000 g für 15 min zentrifugiert wurden, wurden sie in Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) pH 7.4 mit 0.5 % Tween 5 x 1 min mit 40 % Leistung sonifiziert (Sonopuls UW2200, SH2133, TT13, Bandelin). Die Zelltrümmer wurden durch eine 60 minütige Zentrifugation bei 39000 g sedimentiert. Das rekombinante Protein befand sich nach der Zentrifugation im Pellet, in Form von so genannten "*inclusion bodies*" (IBs). Die IBs wurden zwei weitere Male in PBS mit 0.5 % Tween 2 x 1 min sonifiziert und danach für 30 min bei 39000 g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde anschließend dreimal mit PBS wiederholt. Beim vorletzten Waschschrift wurden die IBs über Nacht bei 4 °C mit Benzonase inkubiert (10 ml PBS, 125 U Benzonase). Um die Proteine in Lösung zu bringen, wurde das Pellet 4 h bei 4 °C in Denaturierungspuffer inkubiert und anschließend 1 h bei 39000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde 3 h oder über Nacht bei 4 °C mit Nickel-NTA-Agarose inkubiert. Die Nickel-Agarosematrix wurde für 2 min bei 800 g zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und die Matrix mit Denaturierungspuffer versetzt. Nach drei Waschschritten mit Denaturierungspuffer wurden 2 - 3 ml Agarosematrix für 30 min mit 5 ml Elutionspuffer inkubiert. Die Nickel-Agarosematrix wurde zentrifugiert, der Überstand aufbewahrt und die Matrix für zwei weitere Elutionsschritte verwendet, wobei die Inkubation über Nacht stattfand. Das Eluat wurde anschließend zur Renaturierung über Nacht bei 4 °C dialysiert. Das Protein wurde konzentriert (Vivaspin MWCO 10000, Sartorius Stedim) und mittels Größenausschlusschromatographie von Proteinen anderer Größe und vom Glutathion des Dialysepuffers getrennt. Das gereinigte Protein wurde anschließend konzentriert und bei -20 °C gelagert. Für die NMR-Spektroskopie-Messung wurde der Puffer vom gereinigten His-Upd3 zu NMR-Puffer gewechselt (Nap-10), das Protein konzentriert (Vivaspin 500, 10.000 MWCO) und in ein NMR-Röhrchen (Shigemi) überführt.

Denaturierungspuffer	Elutionspuffer	Laufpuffer
6 M GuHCl	6 M GuHCl	20 mM Tris (pH 8)
50 mM Tris (pH 7.2)	50 mM Tris (pH 7.2)	500 mM NaCl
	250 mM Imidazol	
Dialysepuffer	NMR-Puffer	PBS pH 7.4
20 mM Tris (pH 8)	50 mM NaOAc (pH 5)	137 mM NaCl
500 mM NaCl	Complete	2.7 mM KCl
2 mM GSH	0.02 % Natriumazid	6.4 mM Na ₂ PO ₄
2 M GSSG		1.47 mM KH ₂ PO ₄

2.2.4.2 Reinigung löslicher Proteine

Nach der Proteinexpression wurden die Zellen in PBS mithilfe von Ultraschall aufgeschlossen (5 x 1 min bei 40 % Leistung). Die Zelltrümmer wurden durch eine 60 minütige Zentrifugation bei 39000 g sedimentiert. Nach der Zentrifugation befand sich das Protein im Überstand. Der Überstand wurde steril filtriert und mithilfe eines Äkta-Systems und einer His-Trap Säule (GE Healthcare) gereinigt. Der Puffer des Eluats wurde zu PBS gewechselt und die Probe wurde konzentriert und bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.4.3 Spaltung mit Enterokinase

Für die Spaltung von Fusionskonstrukten mittels Enterokinase wurden 900 µl des gereinigten Trx-Upd3-Fusionsproteins (0.9 µg/µl) in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß mit 18 U Enterokinase (EKMax, Invitrogen) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die gesamte Probe wurde über eine Größenausschlusschromatographie-Säule (Superdex75 16/60, GE Healthcare) separiert und das proteolytisch gespaltene Upd3 isoliert.

2.2.5 Methoden für die Untersuchung der Proteinstruktur

2.2.5.1 Zirkulardichroismus

Die Messungen von His-Upd3 wurden an einem Jasco J-720 Spektropolarimeter (JASCO Germany GmbH, Gross-Umstadt, Deutschland) bei 20 °C durchgeführt. Das Protein befand sich in dem Puffer 20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8 oder 50 mM NaOAc, pH 5. Für den Fern-UV Bereich (250 – 200 nm) wurden Küvetten mit einer Weglänge von 0.01 oder 0.1 cm verwendet. Die Schmelzkurve wurde bei einer Wellenlänge von 222 nm gemessen.

2.2.5.2 Dynamische Lichtstreuung

Die Messungen von His-Upd3 erfolgten in dem Puffer 50 mM NaOAc, pH 5 in einer Quarzküvette mit 1 cm Weglänge. Eventuelle Staubpartikel wurden mithilfe eines Zentrifugenfilters entfernt. 10 Messungen wurden innerhalb von 140 s vorgenommen.

2.2.5.3 Proteolytische Peptidanalyse

His-Upd3 wurde durch eine 30 minütige Behandlung mit Iodacetamid alkylisiert und anschließend durch eine Inkubation mit Chymotrypsin in kürzere Peptide gespalten. Diese Peptide wurden chromatografisch getrennt und massenspektrometrisch charakterisiert.

2.2.6 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

Im Umgang mit eukaryotischen Zellen wurde unter sterilen Bedingungen und mit sterilen Puffern, Medien und Glasgeräten gearbeitet.

2.2.6.1 HEK-293T

HEK-293T-Zellen wurden in Zellkulturschalen (Ø 100 mm) bei 37 °C, 5 % CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre kultiviert. Als Nährstoffquelle diente *Dulbecco's modified Eagle's medium, High Glucose* mit 1 % Pen./Strep. und 10 % *fetal calf serum* (FCS). Zur Kultivierung der Zellen wurden sie alle 2 - 3 Tage mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA von der Zellkulturschale gelöst. Die Zellsuspension wurde in einer neuen Zellkulturschale in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt.

2.2.6.2 Drosophila-Zellen

S2- und Kc 167-Zellen wurden in Schneider's *Drosophila* Medium mit Glutamin mit 5 % FCS und 1 % Pen./Strep. bei 25 °C kultiviert. Die Zellsuspension wurde alle 3 - 4 Tage in einem Verhältnis von 1:2 mit frischem Medium verdünnt. Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen in 45 % konditioniertem Medium mit 10 % FCS, 45 % frischem Medium mit 10 % FCS und 10 % DMSO resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Einfrierröhrchen aliquotiert und bei -80 °C eingefroren, um am Folgetag in flüssigen Stickstoff überführt zu werden.

2.2.6.3 Hybridom-Zellen

Für die Produktion von Antikörpern wurde die Hybridomtechnik angewendet, wobei die Erzeugung von Hybridom-Zellen von Dr. Ahmad Trad durchgeführt wurde. Bei der Immunisierung wurde Mäusen gereinigtes Upd3 mit Thio-redoxin-tag injiziert (Kearney,

Radbruch et al. 1979; Milstein 1999). Zwei Hybridom-Klone (U31-4 und U31-7) wurden in Hybridom-Zellen Medium kultiviert. Die Zellsuspension wurde alle 3 - 4 Tage 1:5 mit frischem Medium verdünnt.

Hybridomzellen Medium

RPMI
 10 % FCS
 1 % Pen./ Strep.
 50 µM β-Mercaptoethanol
 1 mM Natriumpyruvat

***Drosophila* Zellen Medium**

Schneider's *Drosophila* Medium
 5 % FCS
 1 % Pen./ Strep.

HEK Zellen Medium

DMEM
 10 % FCS
 1 % Pen./ Strep.

PBS pH 7.4

137 mM NaCl
 2.7 mM KCl
 6.4 mM Na₂PO₄
 1.47 mM KH₂PO₄

2.2.6.4 Transiente Transfektion von HEK-293 T

Bei der Transfektion von HEK-293T-Zellen wurden die Zellen einen Tag vor dem Transfizieren in einer definierten Zellzahl ausgesät (Tabelle 2). Am nächsten Tag wurde Medium in zwei 1.5 ml Reaktionsgefäße vorgelegt und DNA bzw. Transfektionsreagenz (TurboFect, Fermentas) zugefügt (Tabelle 2). Danach wurde der Transfektionsreagenz-Mix zu dem DNA-Mix pipettiert und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Suspension wurde anschließend vorsichtig in die Vertiefung der 6-Loch Platte bzw. auf die 10 cm Schale geträufelt. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen und vorsichtig Medium mit 5 % FCS auf die Zellen gegeben.

Tabelle 2: Ansätze für die Transfektion in einer 6-Loch Platte oder einer 10 cm Gewebekulturschale

	6-Loch Platte	10 cm Schale
Ausgesäte Zellen	0.45 x 10 ⁶	2 x 10 ⁶
Transfektionsreagenz	4 µl	10 µl
DNA	2 µg	5 µg
Medium	100 µl	500 µl

2.2.6.5 Transiente Transfektion von S2/Kc 167

Bei der Transfektion von *Drosophila*-Zellen wurde nach der Anleitung des Transfektionsreagenz Effectene (Qiagen) gearbeitet. Die Zellsuspension wurde einen Tag vor dem Transfizieren mit frischem Medium verdünnt. Am nächsten Tag wurden die Zellen in einer Neubauer Kammer gezählt und 3×10^6 Zellen je Vertiefung in eine 6-Loch Platte gegeben. Für die Transfektion wurde ausschließlich Schneider's *Drosophila*-Medium mit 0.5 % FCS verwendet.

2.2.7 Produktion und Reinigung der Antikörper

Für die Antikörperproduktion wurden Hybridom-Zellen so oft verdünnt, bis zwanzig dicht bewachsene 10 cm Gewebekulturschalen vorhanden waren. Die Zellen wurden pelletiert, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in Hybridoma Express⁺ Medium mit 50 μ M β -Mercaptoethanol, 1 mM Natriumpyruvat, 10 mM L-Glutamin und 1 % Pen./Strep. resuspendiert. Die Zellen von fünf Platten wurden auf diese Weise in eine 175 cm² Gewebekulturflasche mit 100 ml Hybridoma Express⁺ Medium überführt. Die Flaschen wurden 2 - 4 Wochen bei 37 °C inkubiert. Nachdem die Zellsuspension zentrifugiert wurde, wurde das Zellpellet verworfen und der Überstand steril filtriert und konzentriert (Amicon, Millipore). 40 - 50 ml Konzentrat wurden mithilfe eines Äkta-Systems über eine Protein-G-Säule (GE-Healthcare) gereinigt. Da die Antikörper mit einem sauren Puffer eluiert wurden (100 mM Glycin/HCl pH 2.7), wurden zur Neutralisation des Eluates 60 μ l Tris/HCL pH 9 für 2 ml Eluat in jedes Fraktionsröhrchen vorgelegt. Der Puffer des Eluat wurde anschließend zu PBS gewechselt (Nap-25 Säule, GE Healthcare).

Laufpuffer

20 mM Natriumphosphat (pH 7)

Elutionspuffer

100 mM Glycin/HCl (pH 2.7)

2.2.8 Membranpräparation

Um Membranen zu isolieren wurden mit Upd3 bzw. Limp-2 transfizierte HEK-293T- bzw. Kc 167-Zellen in 200 μ l hypotonem Puffer in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß 5 x für 30 s sonifiziert (Sonifier 450, *Duty cycle* 50 %, *output* 5, Becher-Resonator). Die Suspension wurde für 5 min bei 10000 g zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen und der Überstand mit den Membranen wurde für 1 h bei 186000 g und 4 °C zentrifugiert. Danach wurde das Sediment,

in dem sich die Membranen befanden, in 100 mM Natriumcarbonat-Puffer pH 11.5 sonifiziert und ein weiteres Mal bei 186000 g und 4 °C für 1 h zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde wiederholt, der Überstand entnommen und mit LAP versetzt. Das Sediment mit den Membranen wurde anschließend in hypotonem Puffer sonifiziert und ebenfalls mit LAP versetzt.

Hypotoner Puffer

10 mM Tris pH 7.4

1 mM EGTA

1 mM EDTA

2.2.9 Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie sollte überprüft werden, ob Upd3 an der Oberfläche der Zelle lokalisiert ist. Dafür wurden HEK-293T-Zellen bzw. S2 Zellen mit Upd3 transfiziert und nach zwei Tagen gefärbt und gemessen. Alle Zentrifugationsschritte wurden für 5 min bei 1400 g und 4 °C durchgeführt.

2.2.9.1 Permeabilisierung der Zellen

Um den N-terminus von Upd3 innerhalb der Zelle nachweisen zu können, wurden die zu untersuchenden Zellen permeabilisiert bevor sie mit den Antikörpern inkubiert wurden. Dafür wurden die Zellen durch die Inkubation mit 1 ml 2 % Formaldehyd-Lösung (gelöst in PBS) für 20 min fixiert. Anschließend wurden sie für 10 min in 1 ml Saponin-Puffer inkubiert, welches die Zellmembran permeabilisiert. Saponin-Puffer wurde ebenfalls für die Inkubation der Zellen mit dem ersten Antikörper verwendet.

2.2.9.2 Färbung der Zellen

Transfizierte und nicht transfizierte Zellen wurden mit PBS von einer 6-Loch-Platte gelöst, resuspendiert und anschließend mithilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Für jeden Ansatz wurden $0.5 - 1 \times 10^6$ Zellen in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Die Zellsuspensionen wurden zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment mit 50 µl Antikörper-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden 1 h mit 2 µl des ersten Antikörpers inkubiert (Endkonzentration: α-GFP 16 ng/µl, α-Upd3 280 ng/µl, α-HA 1:25). Danach wurden die Zellen zweimal mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen und mit 50 µl Antikörper-Puffer und 2 µl Antikörper versetzt (Endkonzentration: 20 ng/µl α-Maus-APC, 40

ng/μl α-Kaninchen-PE). Nach 1 h Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen. Für die Messung wurden die Zellen in 500 μl FACS-Puffer resuspendiert.

2.2.9.3 Behandlung der Zellen mit Natriumchlorid

Mit Upd3 transfizierte HEK-293T-Zellen wurden mit PBS resuspendiert und zentrifugiert. Das Sediment wurde dreimal mit PBS mit unterschiedlichen Natriumchlorid-Konzentrationen resuspendiert und zentrifugiert. Als Kontrolle diente PBS mit einer Natriumchlorid-Konzentration von 140 mM. Im letzten Waschschrift wurde für alle Ansätze PBS verwendet.

2.2.9.4 Behandlung der Zellen mit Heparin

Die in PBS resuspendierten Zellen wurden zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellsediment wurde dreimal mit 1.8 U/ml Heparin (gelöst in PBS) resuspendiert und zentrifugiert. Als Kontrolle diente PBS ohne Heparin. Im Anschluss wurden alle Zellen mit PBS resuspendiert und zentrifugiert.

2.2.9.5 Behandlung der Zellen mit Trypsin

Von einer 6-Loch-Platte wurde das Medium aus den Vertiefungen entnommen und die Zellen direkt auf der Platte mit 500 μl Trypsin versetzt. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die Zellen in 2 ml Medium (1 % Pen./Strep., 10 % FCS) resuspendiert und in 15 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden zentrifugiert und in PBS resuspendiert.

FACS-Puffer	Saponin-Puffer	Antikörper-Puffer
PBS	PBS	PBS
1 % BSA	1 % BSA	5 % FCS
0.35 % Natriumazid	0.1 % Natriumazid	0.05 % Natriumazid
	0.1 % Saponin	
PBS pH 7.4		
137 mM NaCl		
2.7 mM KCl		
6.4 mM Na ₂ PO ₄		
1.47 mM KH ₂ PO ₄		

2.2.10 Luciferase-Test

Mit Hilfe des Luciferase-Assay sollte die Aktivität des gereinigten rekombinanten Upd3 getestet werden. Dazu wurden Kc 167-Zellen mit den zwei Vektoren Act-Renilla und 10xSTAT92E-Luciferase transfiziert (Effectene, Qiagen). Am nächsten Tag wurde auf die Zellen gereinigtes Upd3 pipettiert. Als Kontrolle dienten transfizierte Zellen die nicht mit Upd3 inkubiert wurden. Nach 24 h wurden die Zellen resuspendiert, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 4000 g zentrifugiert. Das Zellsediment wurde mit 100 µl Lysispuffer (Dual-Luciferase Reporter Assay, Promega) versetzt und 15 min inkubiert. Das Lysat wurde bei 10000 g zentrifugiert und anschließend auf eine 96-Loch Platte pipettiert. Die Messung der Lumineszenz erfolgte in einem Luminometer (GloMax, Promega) mit den Substraten aus dem Dual-Luciferase Reporter Assay.

2.2.11 Western-Blot

Ein Acrylamidgel wurde mit einem Trenngel der Größe 9 x 6 cm gegossen, welches nach der Elektrophorese in einem Wet-Blot-Tank auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran transferiert wurde. Als erstes wurde das Sammelgel von dem Trenngel entfernt und dieses 5 min in Transferpuffer inkubiert, sowie 8 Blotting-Papiere und eine PVDF-Membran, die vorher mit Methanol aktiviert wurde. Nach der Inkubation wurden 4 Blotting-Papiere, das Gel, die PVDF Membran und weitere 4 Blotting-Papiere übereinander gelegt und eventuelle Luftblasen entfernt. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte bei 200 mA für 90 min. Nach Beendigung des Blots wurde die PVDF Membran vorsichtig aus der Apparatur genommen und in Blockierlösung bei Raumtemperatur für 2 h oder bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die Membran wurde nach dem Blockieren für 2 - 3 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper inkubiert (1:1000), danach zweimal für 10 min mit TBST (Tris gepufferte Salzlösung mit Tween) und einmal mit TBS (Tris gepufferte Salzlösung) gewaschen und anschließend für 1 h mit dem sekundären Antikörper inkubiert (1:5000). Nach der Inkubation wurde die Membran erneut zweimal mit TBST und einmal mit TBS gewaschen. Die Membran wurde mit Western-Blot-Detektionslösung (Amersham oder NEB) überschichtet und mittels eines Lumineszenzdetektors konnten die Signale detektiert werden.

Transferpuffer

25 mM Tris
190 mM Glycin
20 % Methanol
0.01 % SDS

Blockingpuffer/ Antikörperpuffer

200 mM NaCl
50 mM Tris (pH 7.6)
5 % Milchpulver

TBS

200 mM NaCl
50 mM Tris (pH 7.6)

TBST

200 mM NaCl
50 mM Tris (pH 7.6)
0.05 % Tween

3 Ergebnisse

3.1 Strukturvorhersagen über Upd3

3.1.1 Signalpeptidvorhersage

Um zu analysieren wo die potentielle Signalsequenz von Upd3 endet, wurde vor seiner Klonierung in prokaryotische Expressionsvektoren die Aminosäuresequenz durch verschiedene Programme zur Signalpeptidvorhersage untersucht. Unter diesen Programmen befand sich „Phobius“ (Stockholm Bioinformatikzentrum SBC, Schweden), welches kein Signalpeptid identifizieren konnte, sondern einen N-terminalen 50 Aminosäure langen zytoplasmatischen Teil, einen transmembranen und einen C-terminalen nicht zytoplasmatischen Abschnitt, anzeigte (Abbildung 3). Auch das Programm „SignalP“ (Zentrum für biologische Sequenzanalysen CBS, Technische Universität Dänemark) erkannte kein Signalpeptid in der Sequenz von Upd3 (Daten nicht gezeigt).

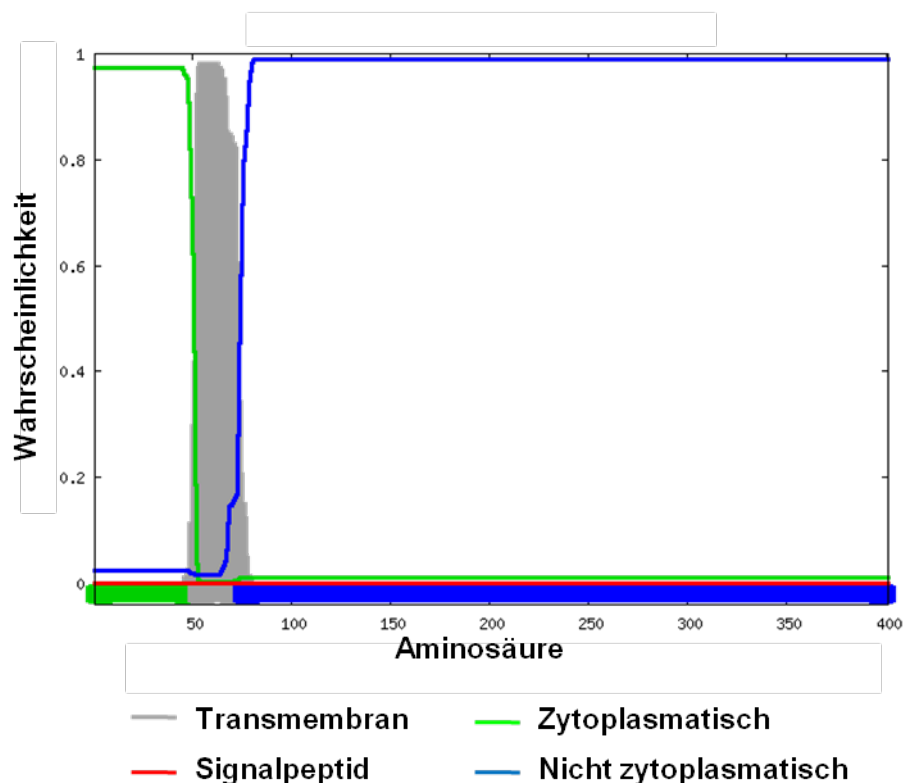


Abbildung 3: Ergebnis der Signalpeptidvorhersage von Upd3, durch das Programm „Phobius“. Dargestellt ist die Wahrscheinlichkeit des Vorkommens von transmembranen (grau), zytoplasmatischen (grün) und nicht zytoplasmatischen (blau) Regionen sowie eines Signalpeptids (rot) innerhalb von Upd3.

3.1.2 Sekundärstrukturvorhersage

Zur Sekundärstrukturvorhersage von Upd3 wurden die Programme „Jpred“ (Universität von Dundee, Schottland) und „PredictProtein“ (ROSTLAB, Technische Universität München, Deutschland) verwendet. Dabei lieferten beide Vorhersagen ähnliche Ergebnisse. Eine schematische Darstellung der Ergebnisse ist in Abbildung 4 gezeigt. Für die Aminosäuresequenz von Upd3 wurden ausschließlich α -helikale Bereiche vorhergesagt. Insgesamt wurden 10 Helices mit mehr als 5 Aminosäuren beschrieben.

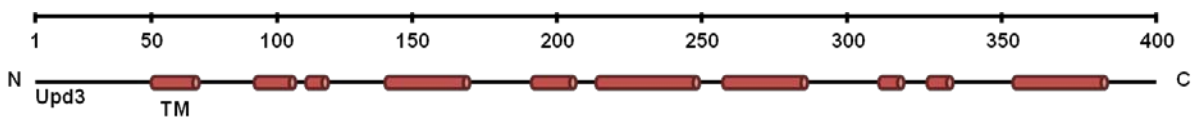


Abbildung 4: Schematische Darstellung der vorhergesagten Sekundärstruktur von Upd3. Analysiert wurde die Primärsequenz von Upd3, welche aus 401 AS besteht. Die roten Zylinder stellen die potentiellen α -helikalen Bereiche dar. Helices in denen weniger als 5 Aminosäurereste enthalten sind wurden nicht dargestellt. Die erste Helix (N-terminal) wurde von „PredictProtein“ als eine Transmembranhelix vorhergesagt. TM = transmembran

3.2 Oberflächenexpression von Upd3

In der Aminosäuresequenz von Upd3 wurde kein konventionelles Signalpeptid, jedoch eine transmembrane α -Helix vorhergesagt. Daher besteht die Möglichkeit, dass Upd3 ein transmembranes Protein ist. Um dies zu überprüfen, wurden HEK-293T-Zellen und Schneider Zellen (S2) mit DNA, die für HA-Upd3-GFP kodiert, transfiziert (Abbildung 5) und mittels Durchflusszytometrie und Membranisolierung analysiert.

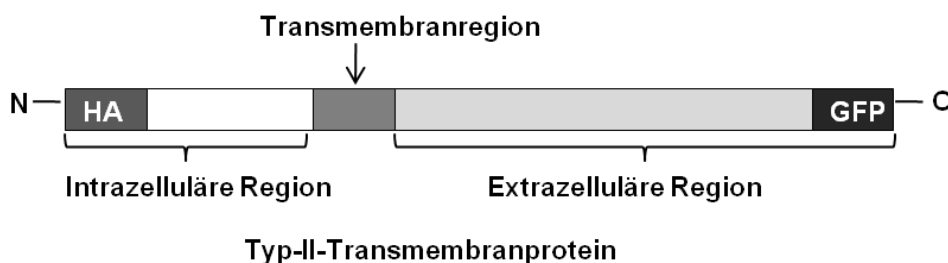


Abbildung 5: Schematische Darstellung des HA-Upd3-GFP Konstruktes. Upd3, welches für die Durchflusszytometrie und Membranisolierung verwendet wurde, wurde N-terminal mit einem HA-tag und C-terminal mit einer GFP-Markierung fusioniert. Gekennzeichnet sind der potenzielle intrazelluläre, der transmembrane und der extrazelluläre Bereich. Mit einem intrazellulären N-Terminus und einem extrazellulären C-Terminus würde Upd3 zu den Typ-II-Transmembranproteinen zählen.

3.2.1 Durchflusszytometrie

HEK-293T-Zellen und Schneider-Zellen (S2) wurden mit einem Vektor transfiziert auf dem HA-Upd3-GFP kodiert war. Wildtyp- und transfizierte Zellen wurden für den Nachweis der C-terminalen GFP-Markierung mit anti-GFP- und anti-Maus-APC-Antikörpern inkubiert. Für den Nachweis von N-terminalem HA-*tag* wurden die Zellen mit anti-HA- und anti-Kaninchen-PE-Antikörper gefärbt. Diese Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert. In der Abbildung 6 sind die Ergebnisse der Messungen dargestellt. Die rote Kurve zeigt jeweils das Signal der untransfizierten Wildtyp-Zellen und die blaue Kurve stellt das Signal der transfizierten Zellen dar. Bei den APC gefärbten Zellen (Abbildung 6 A und B) ist zu erkennen, dass das Emissionsmaximum der mit Upd3 transfizierten Zellen im Vergleich zu den untransfizierten Zellen stark nach rechts verschoben ist. Das bedeutet, dass sich Upd3 an der Oberfläche befand. Um zu überprüfen, ob der N-terminale HA-*tag* im Inneren der Zelle lokalisiert ist, wurden die Zellen permeabilisiert und mit einem Antikörper gegen den HA-*tag* inkubiert. Zur Kontrolle wurden intakte Zellen mit dem gleichen Antikörper gefärbt. Bei den transfizierten permeabilisierten Zellen traten zwei Emissionsmaxima auf (Abbildung 6 C). Das erste Maximum entspricht in seiner Intensität dem Maximum der untransfizierten Zellen. Demgegenüber zeigt das zweite Maximum eine deutliche rechts Verschiebung. Des Weiteren ist zu erkennen, dass bei den intakten Zellen (Abbildung 6 D) keine Verschiebung des Emissionsmaximums stattfand. Das heißt, dass der N-Terminus des HA-Upd3-GFP-Konstruktes nur im Inneren der Zellen, nicht aber außerhalb der Zellen nachgewiesen werden konnte.

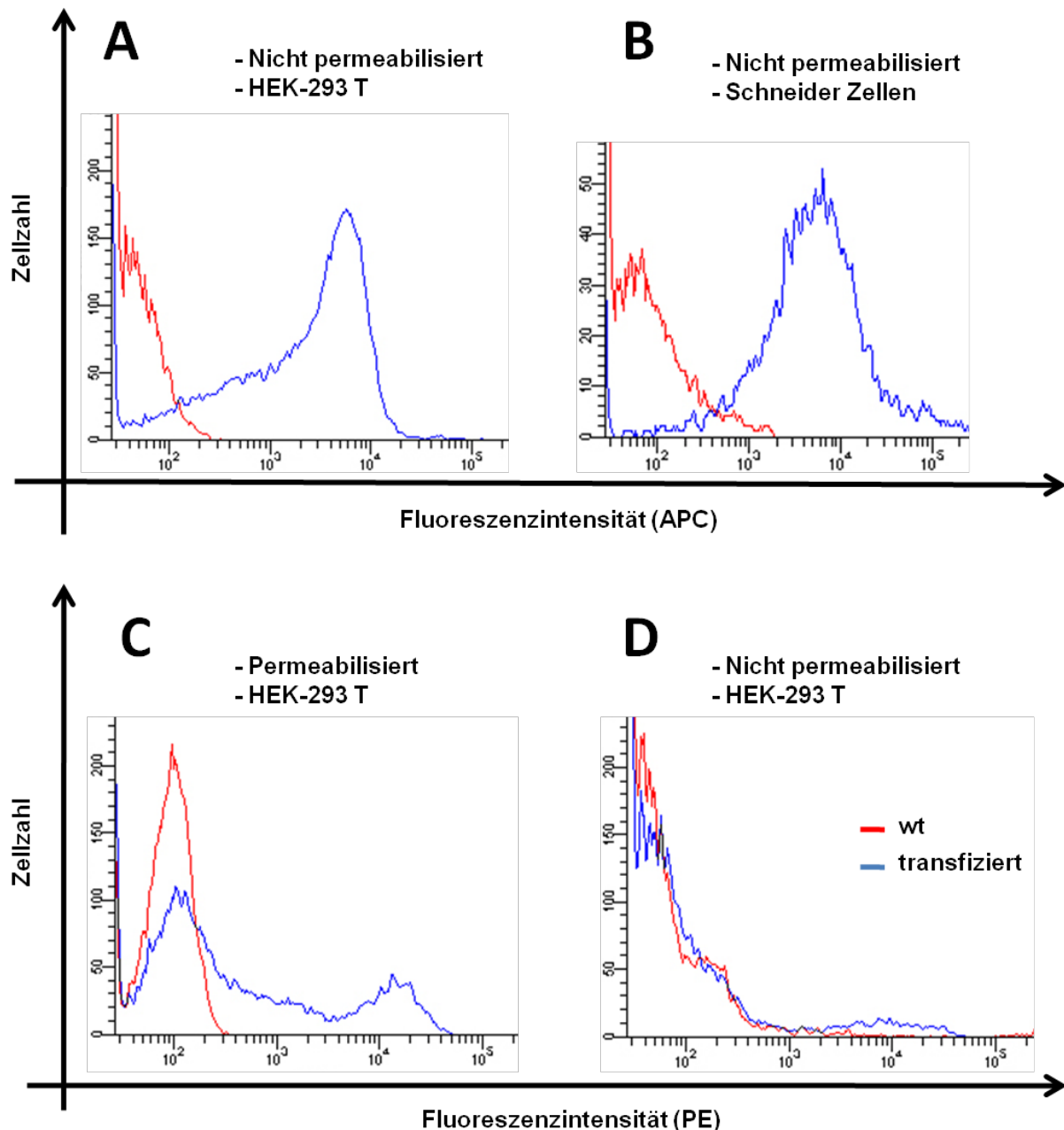


Abbildung 6: Untersuchung von Upd3 an der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie. Intakte HEK-293T-Zellen (A) und Schneider Zellen (B) wurden mit einem gegen GFP-tag gerichteten Antikörper mittels APC (Allophycocyanin)-gekoppelten Antikörper gefärbt. Zur Färbung von permeabilisierten (C) und nicht permeabilisierten HEK-293T-Zellen (D) wurde ein Antikörper gegen den HA-tag verwendet. Die Detektion erfolgte mit einem PE (R-Phycoerythrin)-gekoppelten Antikörper. Angezeigt ist die Fluoreszenzintensität der gefärbten Zellen.

Um zu untersuchen, ob Upd3 ein Transmembranprotein ist, oder lediglich Membran-assoziiert vorliegt, waren weitere Analysen mittels Durchflusszytometrie erforderlich. Das Ablösen von Proteinen von der Zelloberfläche durch hohe Ionenkonzentration ist ein Hinweis auf eine Membran-Assoziation. Demnach wurden Wildtyp und mit HA-Upd3-GFP-DNA transfizierte HEK-293T-Zellen mit Puffern unterschiedlicher Natriumchloridkonzentrationen

gewaschen. Der Waschschrift wurde dreimal wiederholt und anschließend wurden die Zellen gefärbt. Die Untersuchungen zeigten, dass das Signal der transfizierten Zellen im Gegensatz zu den Wildtyp-Zellen eine deutliche Verschiebung nach rechts zeigte. Des Weiteren ist zu erkennen, dass die Fluoreszenzintensität durch das Waschen mit Natriumchlorid (NaCl) nicht abnahm. Allerdings verringerte sich die Zellzahl mit erhöhter NaCl-Konzentration, was der Empfindlichkeit der Zellen gegenüber hoher Salzkonzentration entspricht (Abbildung 7 A). Aus den Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass Upd3 nicht mit hohen Ionenkonzentrationen von der Membran gewaschen werden kann, was für ein transmembranes Protein spricht.

Da die Bindung von Proteinen an die Zelloberfläche oft über Glykosaminglykane, wie Heparansulfat erfolgt, wurde in einem weiteren Versuch Wildtyp und transfizierte HEK-293T- und Schneider-Zellen mit steigenden Konzentrationen von Heparin gewaschen und anschließend gefärbt. Die anschließende Analyse zeigte, dass die transfizierten Zellen im Gegensatz zu den untransfizierten Zellen mit hoher Intensität fluoreszierten und somit Upd3 auf der Zelloberfläche exprimierten. Die Intensität nahm jedoch ab als die Zellen mit Heparin gewaschen wurden (Abbildung 7 C). Die Analysen der Schneider Zellen ergaben das gleiche Ergebnis. Auch hier zeigten die transfizierten Zellen, im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen, eine Verschiebung nach rechts. Diese Fluoreszenzintensität verringerte sich durch das Waschen der transfizierten Zellen mit Heparin (Abbildung 7 D). Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Upd3 über die Bindung von Glykosaminglykanen Membran-assoziiert ist. Um weiter zu verifizieren, dass es sich bei Upd3 um ein Transmembranprotein handelt, wurden Wildtyp und mit HA-Upd3-GFP-DNA transfizierte HEK-293T-Zellen mit Trypsin inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 2 und 10 min wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend gefärbt. Anhand der Ergebnisse (Abbildung 7 B) ist zu erkennen, dass bei den transfizierten Zellen im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen eine höhere Fluoreszenzintensität detektiert wurde und dementsprechend Upd3 auf der Zelloberfläche lokalisiert ist. Die Intensität nahm ab, je länger die Zellen mit Trypsin inkubiert wurden. Das bedeutet, dass Upd3 durch Trypsin von der Zellmembran entfernt werden konnte. Dieses Ergebnis ist ein Hinweis darauf, dass Upd3 ein Transmembranprotein ist.

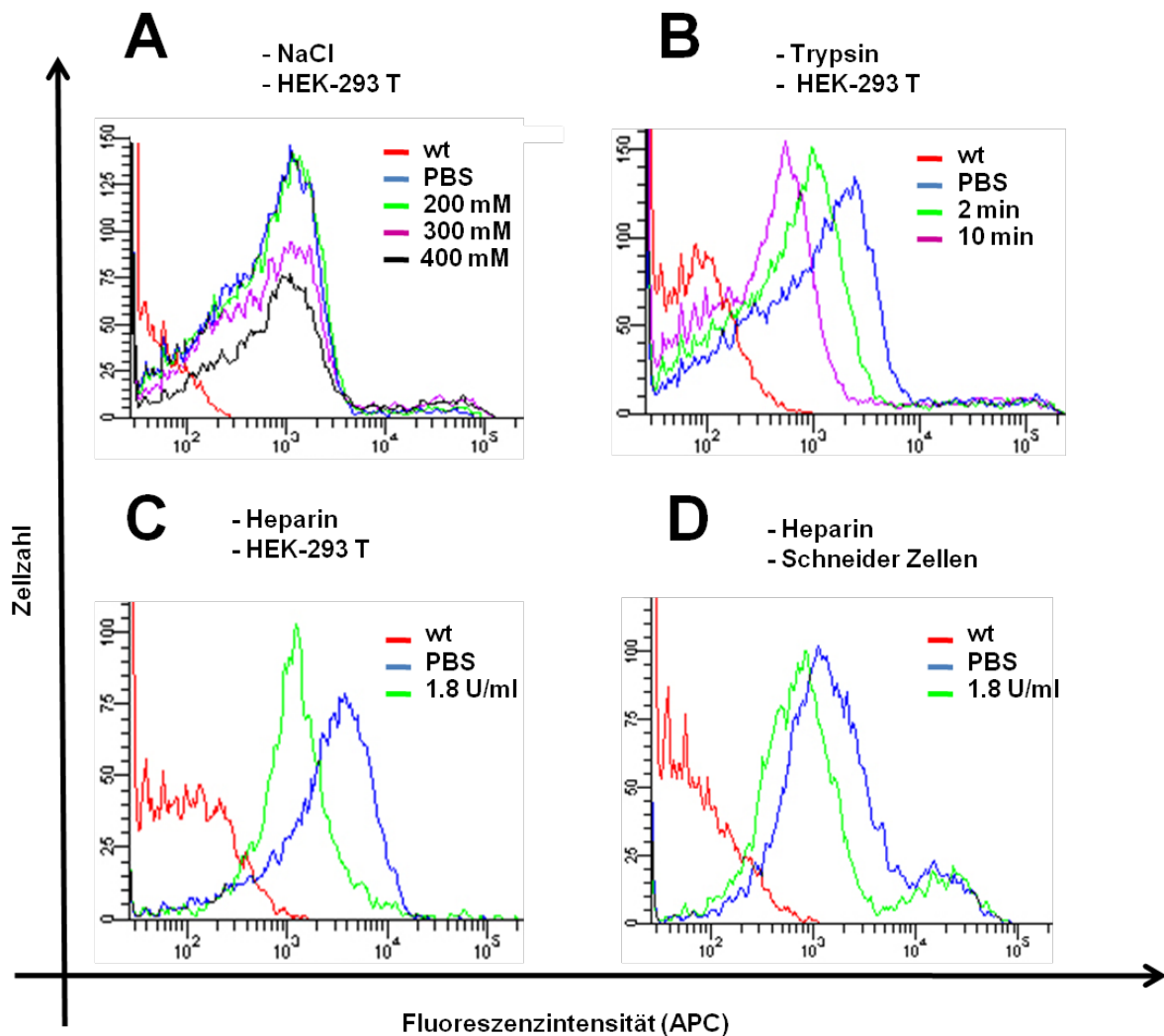


Abbildung 7: Durchflusszytometrie mit Upd3-transfizierten Zellen nach verschiedenen Waschschritten. Wildtyp (wt)- und transfigierte Zellen wurden mit (A) NaCl (gelöst in PBS) gewaschen, mit (B) Trypsin inkubiert oder mit (C, D) Heparin (gelöst in PBS) gewaschen. Die Zellen wurden mit den Antikörpern α -GFP-Maus-IgG und α -Maus-APC-IgG gefärbt. Angezeigt ist die Fluoreszenzintensität der Zellen.

3.2.2 Membranisolierung

Um die Ergebnisse der Durchflusszytometrie zu bestätigen, wurde mit HEK-293T-Zellen und S2-Zellen eine Membranisolierung durchgeführt. Mit dieser Methode sollte untersucht werden ob Upd3 ein Transmembranprotein ist oder mit der Membran assoziiert vorliegt. Demnach wurde überprüft ob sich Upd3 durch Calciumcarbonatpuffer mit einem pH-Wert von 11.5 von der Membran ablösen lässt. HEK-293T-Zellen wurden mit dem gleichen Upd3-Konstrukt transfigiert, wie in den Durchflusszytometrie-Versuchen (Abbildung 5). Nachdem die Zellen lysiert wurden, wurden die in dem Lysat befindlichen Membranen mit Carbonatpuffer (pH 11.5) gewaschen. Von dem Membran-Sediment und von dem Überstand wurde jeweils eine Probe entnommen. Mithilfe eines Western Blots wurde überprüft ob sich

Upd3 im Überstand oder im Sediment befindet. Dabei wurde Upd3 mit zwei verschiedenen Antikörpern detektiert. In der Abbildung 8 A ist der mit α -HA-Antikörper inkubierte Western Blot zu sehen. Hier konnte Upd3 im Lysat, im Sediment und nur sehr schwach im Überstand detektiert werden. Anhand des Proteinstandards konnte eine ungefähre Größe von 80 kDa bestimmt werden. Mit dem Antikörper der direkt gegen Upd3 gerichtet ist, wurde ebenfalls ein Western Blot analysiert (Abbildung 8 B). Auch hier konnte Upd3 im Lysat, im Sediment und sehr schwach im Überstand nachgewiesen werden. In der Abbildung 8 C ist das Ergebnis des Versuches mit dem *Lysosomal integrated membrane protein-2* (Limp-2) dargestellt, ein Transmembranprotein, das als Kontrolle verwendet wurde (Reczek, Schwake et al. 2007; Saftig, Schröder et al. 2010). Wie Upd3 konnte Limp-2 anhand seines HA-tags im Lysat, im Überstand und im Sediment nachgewiesen werden. Wobei im Überstand weniger Limp-2 detektiert wurde als im Lysat und im Sediment.

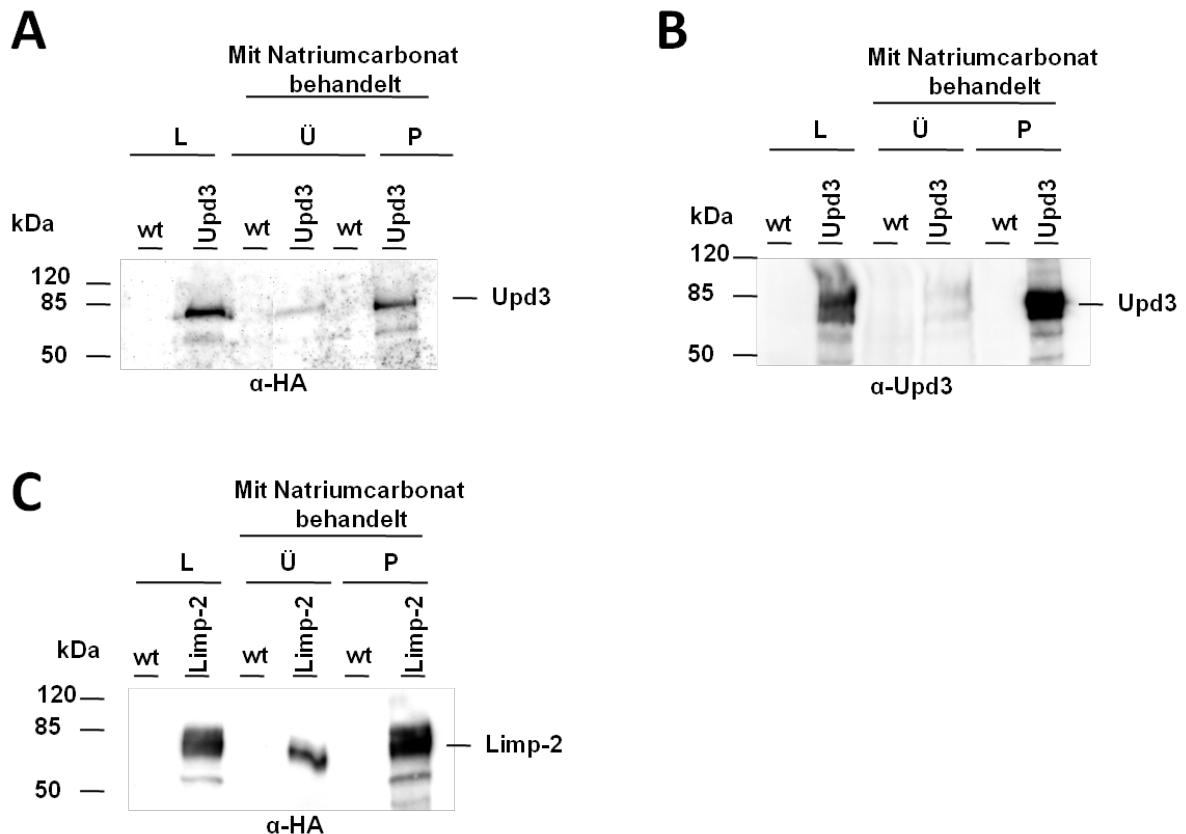


Abbildung 8: Membranpräparationen von Upd3 transfizierten HEK 293T-Zellen. Western Blot-Analyse von Proben aus der Membranpräparation. A) Upd3 wurde detektiert mit einem Antikörper, der gegen den HA-tag gerichtet ist. B) Upd3 wurde mit einem Upd3-spezifischen Antikörper detektiert. C) Als Kontrolle dienten mit Limp-2 transfizierte Zellen. Die Detektion von Limp-2 erfolgte durch einen α -HA-Antikörper. wt = Wildtyp, L = Lysat, Ü = Überstand, P = Sediment.

3.3 Charakterisierung des rekombinanten Upd3

3.3.1 Reinigung des N-terminal Trx-markierten Upd3

3.3.1.1 Trx-Upd3 Konstrukt

Wie zuvor dargestellt, weist die Aminosäuresequenz von Upd3 (GenBank: AAX52505) kein typisches Signalpeptid auf. Dem gegenüber könnte die potentielle N-terminale hydrophobe Helix als transmembraner Bereich fungieren. Auf Grund dessen wurde zur rekombinanten Expression ein Konstrukt gewählt, welches nach diesem hydrophoben Abschnitt beginnt (Abbildung 9). Diese Sequenz wurde in den Vektor pET32a kloniert, wodurch ein Fusionskonstrukt entstand. Das exprimierte Protein enthielt einen His-tag, einen Thioredoxin-tag und den „extrazellulären Teil“ von Upd3 (Abbildung 10 A). In dem folgenden Abschnitt wurde für dieses Konstrukt ausschließlich die Bezeichnung Trx-Upd3 verwendet.

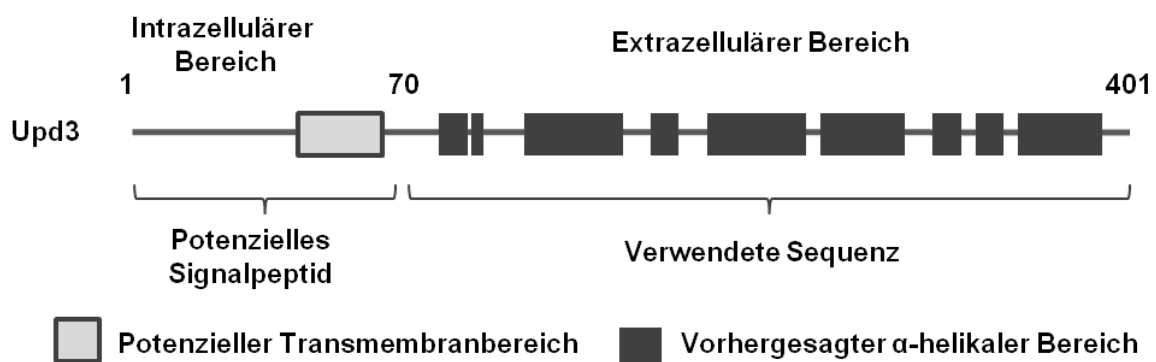


Abbildung 9: Schematische Darstellung von Upd3. Für die Klonierung von Trx-Upd3 wurde die angezeigte Primärsequenz von Aminosäurerest 70 bis 401 verwendet. Das exprimierte Trx-Upd3 besteht aus der gekennzeichneten Sequenz fusioniert mit Thioredoxin und einem His-tag.

3.3.1.2 Expression des Trx-Upd3

Die Expression des Trx-Upd3 erfolgte in den *E. coli*-Stämmen BLR und BL21. Zur Überprüfung der Expression wurde aus der Bakterienkultur eine Probe vor Zugabe von IPTG und eine weitere Probe drei Stunden nach der Induktion der Proteinexpression durch 0.3 mM IPTG entnommen. Bei den Proben erfolgte eine Anpassung der Zelldichte, sodass auf dem SDS-Gel von den Proben vor und nach Induktion das Lysat von gleich vielen Bakterien aufgetragen wurde. Upd3 konnte in beiden *E. coli*-Stämmen exprimiert werden, wobei die Expressionsbande von Upd3 in BL21 doppelt so stark erschien wie die in BLR (Abbildung 10 B). Nach der Expression erfolgte eine Überprüfung mittels SDS-Gel, ob Trx-Upd3 löslich

oder in *inclusion bodies* (IBs) exprimiert wurde. Dazu wurden nach dem Sonifizieren und anschließendem Zentrifugieren der beiden *E. coli*-Stämme Proben für ein SDS-Gel aus dem Überstand und dem Sediment entnommen. Trx-Upd3 wurde bei BL21 als unlösliches Protein im Sediment detektiert, jedoch nicht im Überstand. In BLR exprimiertes Trx-Upd3 konnte im Überstand detektiert werden (Abbildung 11 B).

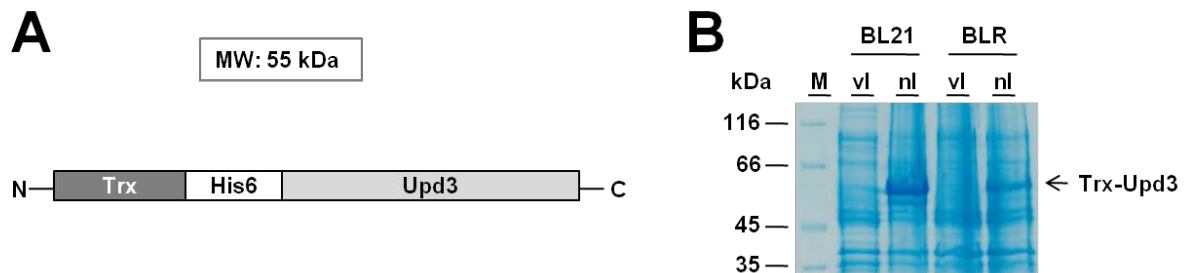


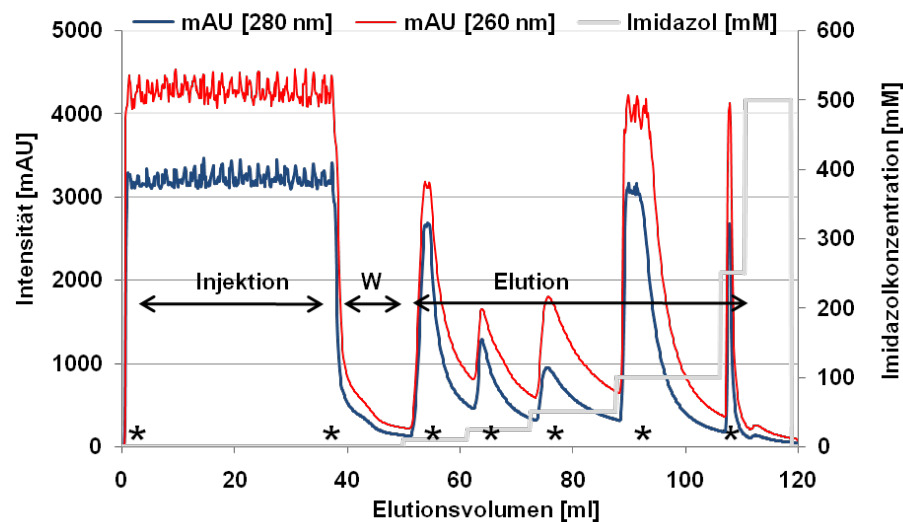
Abbildung 10: Schematische Darstellung des Trx-Upd3-Konstrukts und Expressionsgel von Trx-Upd3. A) Trx-Upd3 besitzt einen N-terminalen Thioredoxin- und His-tag sowie den vorhergesagten extrazellulären Abschnitt von Upd3. B) SDS-Gel der Expression von Trx-Upd3 in BL21 und BLR. vl = vor Induktion; nl = nach Induktion; M = Größenstandard, N = Amino-Terminus, C = Carboxy-Terminus.

3.3.1.3 Reinigung des löslich exprimierten Trx-Upd3

Für die Reinigung des löslichen Proteins erfolgte eine Lyse der BLR-Zellen. Der Überstand wurde steril filtriert und das darin befindliche Trx-Upd3 mittels einer Ni-NTA-Agarose-Säule gereinigt. Abbildung 11 A zeigt, dass die Beladung der Ni-Agarose-Säule mit 38 ml Überstand erfolgte, dabei stieg die Absorption über den Detektionsbereich, was durch das Rauschen oberhalb von 3000 mAU erkennbar wurde. Nach anschließendem Waschschrift mit 10 ml PBS sank die Absorption. Im darauffolgenden Verlauf wurde dem PBS in steigender Konzentration Imidazol zugefügt, wobei zu erkennen ist, dass bei jeder Erhöhung der Imidazolkonzentration Protein eluiert wurde und so eine erhöhte Absorption detektiert werden konnte. Aus den Fraktionen der Injektion und der Elution wurden Proben entnommen und mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 11 B). Auf dem Gel ist in der Probe aus dem Überstand (neben Banden, die nicht dem Zielprotein entsprechen) die Bande von Trx-Upd3 zu erkennen. Diese Bande ist in der letzten Fraktion der Injektion (Abbildung 11 A 2. Sternchen) stärker vorhanden als in der 1. Fraktion (Abbildung 11 A 1. Sternchen). Des Weiteren ist auf dem Gel zu erkennen, dass die anfänglichen Waschschriffe mit niedrigen Imidazolkonzentrationen viele unspezifische Banden enthielten, es wurden also die unspezifisch gebundenen Proteine eluiert. Bei einer Imidazolkonzentration von 100 mM und 250 mM trat die Bande von Trx-Upd3 auf, das Protein wurde eluiert. Die Probe des letzten Peaks wies auf dem Coomassie-Gel kaum unspezifische Banden, dafür aber eine intensive

Bande des Trx-Upd3 auf. Die rote Kurve im Diagramm zeigt die Absorption bei 260 nm, welche in diesem Reinigungsschritt stets höher war als die bei 280 nm. Dies deutet darauf hin, dass die Proben mit DNA verunreinigt waren. Anschließende Analysen mittels Agarosegel bestätigten dies (Daten nicht gezeigt). Eine Inkubation der Fraktion mit der Nuklease „Benzonase“ und anschließende Reinigung mittels Größenausschlusschromatografie konnte nicht zu einer Senkung des DNA-Gehalts führen (Daten nicht gezeigt).

A



B

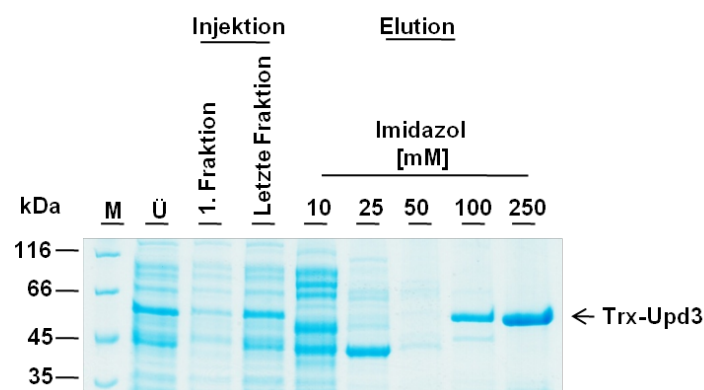


Abbildung 11: Reinigung des löslich exprimierten Trx-Upd3. A) Der erste Reinigungsschritt erfolgte mittels His-Trap-Säule und Äkta-System. Dargestellt ist die Absorption bei 260 und 280 nm. Die ersten 40 ml zeigen den Durchlauf der Beladung der Säule an. In grau ist der Anstieg der Imidazolkonzentration angezeigt, aufgrund dessen die verschiedenen Peaks nach 40 ml gemessen werden konnten. Die Sterne deuten auf die Proben, welche mittels SDS-Gel analysiert wurden. B) Die Fraktionen der Absorptionsmaxima wurden mittels SDS-Gel analysiert. Zu sehen sind der Überstand vor der Reinigung, die erste und die letzte Fraktion der Injektion und Proben der Peaks, die durch die Elution mittels aufsteigender Imidazolkonzentrationen entstanden. W = Waschschritt, M = Größenstandard, Ü = Überstand.

3.3.1.4 Reinigung des Trx-Upd3 aus *inclusion bodies*

Für die Reinigung des Proteins aus *inclusion bodies* (IBs) erfolgte eine Lyse der BL21-Zellen. Um die gebundene DNA von Trx-Upd3 zu entfernen, wurden die IBs über Nacht in PBS mit „Benzonase“ inkubiert. Die von der „Benzonase“ gespaltene DNA konnte in dem darauf folgenden Reinigungsschritt entfernt werden. Um aus dem aggregierten Protein lösliches Trx-Upd3 zu gewinnen, wurden die IBs in Guanidinhydrochlorid gelöst. Das denaturierte Protein wurde mithilfe seines His-tags und Nickel-NTA-Agarosematrix gereinigt. Die Reinigungsschritte sind auf dem Gel (Abbildung 12) dargestellt. Nach dem Waschen der IBs wurden diese mit Guanidinhydrochlorid inkubiert und anschließend zentrifugiert. Vom Überstand wurde eine Probe entnommen. Auf dem Gel sind in der Probe vom Überstand mehrere Banden zu erkennen, wobei eine der Banden sehr intensiv ist. Die entnommenen Proben der Waschschrte und der Eluate sind auf dem Gel unter W und E dargestellt. Bei den Waschschrten ist jeweils eine Bande zu erkennen, wobei diese Bande bei W1 stärker ist als bei W4. Bei den Proben der Eluate sind mehrere starke Banden zu erkennen. Eine Bande, welche in allen Proben präsent war, lag zwischen 45 und 66 kDa, was der theoretischen Größe von Trx-Upd3 entspricht. Nach der Reinigung wurde mit einem Photospektrometer überprüft ob sich in dem Eluat noch DNA befand. Bei dem Spektrum lag das Absorptionsmaximum bei 280 nm. Das bedeutet, dass die DNA aus der Probe entfernt werden konnte. Um Trx-Upd3 in seiner korrekt gefalteten Form zu gewinnen, wurden verschiedene Pufferbedingungen für eine Rückfaltung mittels Dialyse getestet (Abbildung 13).

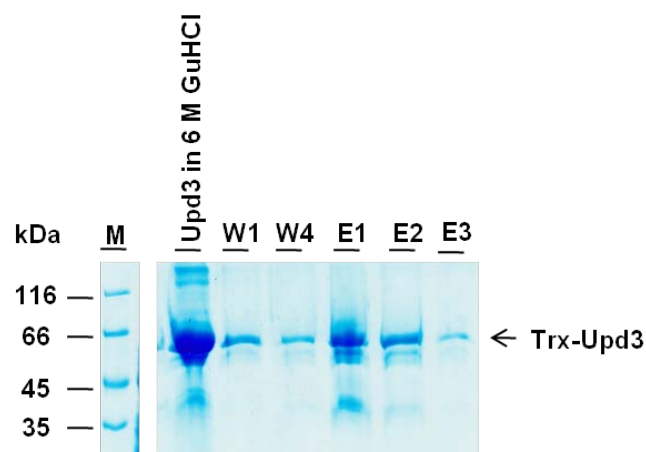


Abbildung 12: Reinigung von denaturiertem Trx-Upd3. Die Reinigung erfolgte mithilfe einer Nickel-NTA-Agarosematrix. Zu sehen ist ein SDS-Gel mit den einzelnen Reinigungsschritten. Upd3 vor der Reinigung gelöst in Guanidinhydrochlorid, die Waschschrte 1 und 4 und die drei Elutionsschritte. M = Größenstandard, W = Waschschrte, E = Eluat.

Die Bestimmung geeigneter Renaturierungsbedingungen erfolgte mittels „*rapid dilution*“ in verschiedenen Puffern mit pH-Werten zwischen 4 und 9. Trx-Upd3 blieb bei allen pH-Werten in Lösung (Daten nicht gezeigt). Die Rückfaltung mittels Dialyse erfolgte bei drei verschiedenen pH-Werten, die sich um den neutralen Bereich befanden. Dafür wurden je 1 ml Eluat gegen 500 ml Puffer (pH 6.0, 7.0 oder 8.0) mit 150 mM bzw. 500 mM NaCl, 2 mM reduziertes Glutathion und 0.2 mM oxidiertes Glutathion dialysiert. Aggregiertes Protein wurde sedimentiert und der Überstand mit einem Photospektrometer überprüft. Bei der Dialyse des Trx-Upd3 gegen einen Puffer mit einem pH-Wert von 7, konnte nur sehr wenig lösliches Protein detektiert werden. Nach der Dialyse bei pH 8 konnte eine höhere Menge an Trx-Upd3 im Überstand gemessen werden. Den höchsten Proteinertrag ergab die Dialyse bei pH 6 (Daten nicht gezeigt). Demnach wurde mit den Puffern mit den pH-Werten 6 und 8 weiter gearbeitet. Anschließend erfolgten Dialysen mit unterschiedlichen Zusätzen (Abbildung 13 A). Dieser Versuch wurde zweimal durchgeführt und die „Mittelwerte“ in einem Säulendiagramm dargestellt (Abbildung 13 B). Wie in der Abbildung 13 B zu erkennen ist, konnte in den Proben, welche bei pH 6 dialysiert wurden, die größte Proteinmenge detektiert werden. Nach einigen Reinigungs-Versuchen mittels Größenausschlusschromatografie konnte jedoch kein Trx-Upd3 isoliert werden. Da sich das Protein auch bei pH 8 renaturieren ließ, wurde die Reinigung mit einem Puffer mit 20 mM Tris (pH 8) und 500 mM Natriumchlorid durchgeführt. Dieser Puffer wurde gewählt, weil er die geringste Menge an Zusätzen beinhaltet, aber eine ausreichende Ausbeute von löslichem Protein vorhanden war.

A

	1	3	5	7	9	11	13	15	17
pH 6	20 mM NaOAc 150 mM NaCl	20 mM NaOAc 500 mM NaCl	20 mM NaOAc 150 mM NaCl 0,05 % Tween	20 mM NaOAc 500 mM NaCl 0,05 % Tween	20 mM NaOAc	20 mM NaOAc 0,05 % Tween	20 mM NaOAc 5 % Glycerin	20 mM NaOAc 150 mM NaCl 5 % Glycerin	20 mM NaOAc 500 mM NaCl 5 % Glycerin
	2	4	6	8	10	12	14	16	18
pH 8	20 mM Tris 150 mM NaCl	20 mM Tris 500 mM NaCl	20 mM Tris 150 mM NaCl 0,05 % Tween	20 mM Tris 500 mM NaCl 0,05 % Tween	20 mM Tris	20 mM Tris 0,05 % Tween	20 mM Tris 5 % Glycerin	20 mM Tris 150 mM NaCl 5 % Glycerin	20 mM Tris 500 mM NaCl 5 % Glycerin

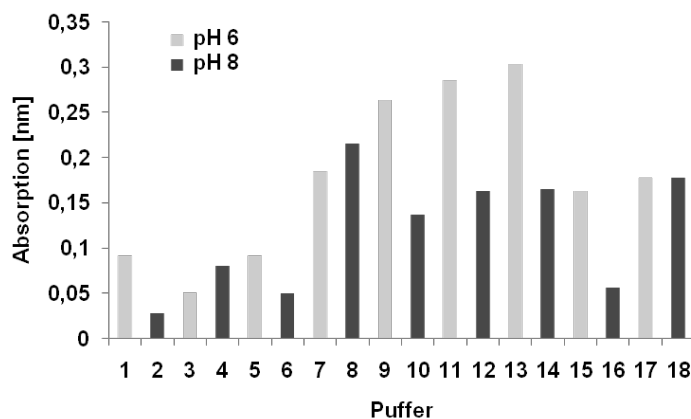
B

Abbildung 13: Rückfaltung von denaturiertem Trx-Upd3. A) Zusammensetzung der getesteten Dialysepuffer. In allen Puffern war ein Redoxsystem, bestehend aus 2 mM reduziertem Glutathion und 0,2 mM oxidiertem Glutathion, vorhanden. B) Die Absorption des löslichen Proteins bei 280 nm nach der Dialyse.

Nachdem ein geeigneter Puffer gefunden wurde, wurde Trx-Upd3 über Nacht dialysiert. Das Dialysat wurde konzentriert und Trx-Upd3 mittels Größenausschlusschromatografie gereinigt (Abbildung 14 A). Das Säulenvolumen betrug 120 ml und nach 51 ml konnte ein Absorptionsmaximum detektiert werden. Anhand einer zuvor erstellten Kalibrierungskurve konnte die molekulare Größe mit ca. 75,6 kDa berechnet werden. Das zweite Maximum, das nach 100 ml detektiert werden konnte, wurde außer Acht gelassen, da die Absorption bei 260 nm höher war als bei 280 nm. Aus der Fraktion des ersten Maximums wurde eine Probe entnommen und mithilfe eines SDS-Gels und einem Western-Blot überprüft (Abbildung 14 B). Auf dem Gel ist eine intensive Bande zwischen 45 und 66 kDa zu sehen. Es konnte keine weitere Bande detektiert werden. Auf dem Western-Blot ist zu erkennen, dass diese Bande das Zielprotein Trx-Upd3 ist, da es durch den Antikörper, der gegen den N-terminalen His-tag gerichtet ist, detektiert wurde.

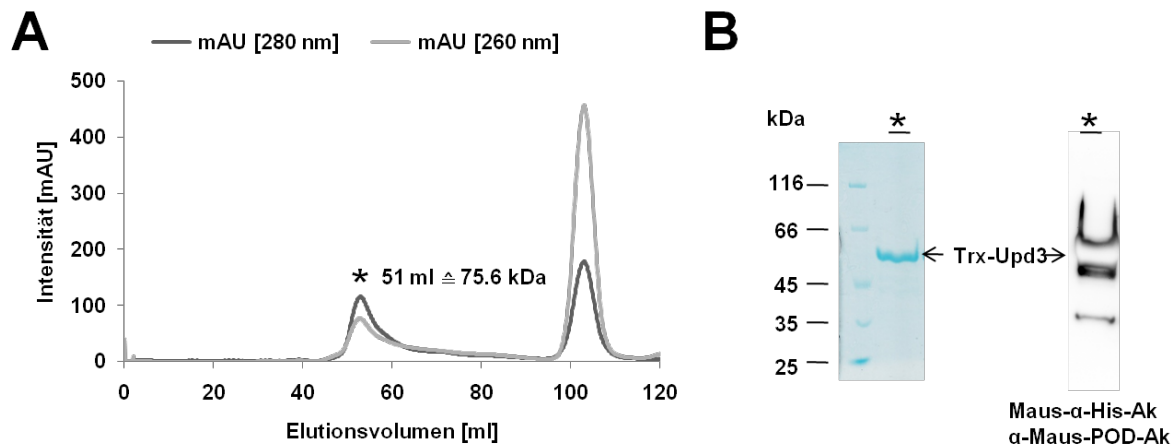


Abbildung 14: A) Größenausschlusschromatografie mit dialysiertem Trx-Upd3. Trx-Upd3 wurde mittels einer Superdex75 16/60-Säule gereinigt. Durch die Detektion bei 280 nm und 260 nm wurde der Verlauf der Reinigung verfolgt. B) Eine Probe des Proteins (Peak *) wurde mit SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. POD = Peroxidase, Ak = Antikörper.

3.3.1.5 Spaltung von Trx-Upd3 mit Enterokinase

Nach der Reinigung des Fusionsproteins sollte der Thioredoxin-*tag* abgespalten werden, da dieser *tag* eine Strukturaufklärung unmöglich macht und sich negativ auf die Antikörperproduktion auswirken kann. Bei der Klonierung des Trx-Upd3-Konstrukts wurde deswegen zwischen der Zielproteinsequenz und der His-*tag*-Sequenz die Enterokinase (EK)-Schnittstelle-Sequenz eingefügt, so dass beide *tags* nach der Reinigung abgespalten werden konnten (Abbildung 15 A). Auf dem SDS-Gel (Abbildung 15 B) ist in der ersten Spur neben dem Größenstandard eine Probe des ungespaltenen Fusionsproteins zu sehen. In den restlichen Spuren sind Proben der Proteinlösung dargestellt, welche 1 – 5 h beziehungsweise über Nacht mit Enterokinase inkubiert wurden. Nach 1 h konnte die Bande des Fusionsproteins nur noch schwach detektiert werden. Dafür traten neue Banden im unteren Bereich des Gels auf. Zwischen 25 und 45 kDa wurden nach 1 - 2 h mehrere Banden sichtbar, die sich nach 5 h oder über Nacht auf eine Bande unterhalb von 35 kDa reduzierten. Zwischen 14 und 18 kDa erschienen zwei Banden, welche mit steigender Inkubationsdauer schwächer wurden. Es ist zu erkennen, dass eine vollständige Spaltung erst nach einer Inkubationszeit von mehreren Stunden über Nacht erfolgte. Höhere Konzentrationen der Enterokinase und somit eine kürzere Inkubationszeit wurden ausgeschlossen, da das Fusionsprotein unter diesen Bedingungen unspezifisch gespalten wurde (Daten nicht gezeigt). Um die Spaltung kontrollierbar zu gestalten, wurde eine niedrige Konzentration der EK gewählt und eine längere Inkubationszeit vorgenommen.

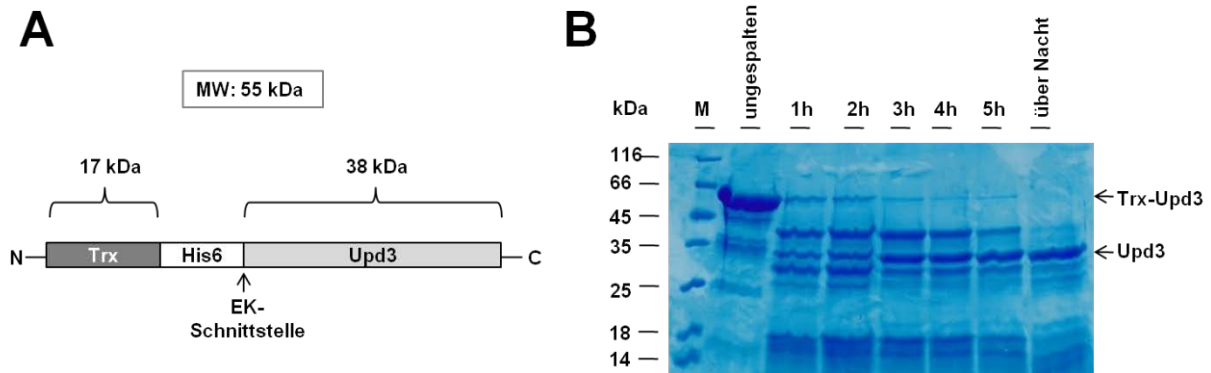


Abbildung 15: Der Thioredoxin-tag wurde mit EK von Upd3 abgespalten. A) Konstrukt mit Größenangaben des Trx-tags und dem extrazellulären Abschnitt von Upd3. B) SDS-Gel mit ungespaltenem Fusionsprotein und Proben einer Spaltung nach unterschiedlichen Inkubationszeiten, wobei 0.5 U EK pro 25 µg Trx-Upd3 verwendet wurde.

Nach erfolgreicher Spaltung des Fusionsproteins wurde Upd3 mittels Größenausschlusschromatografie von dem tag getrennt. In der Abbildung 16 A ist das Ergebnis der Größenausschlusschromatografie dargestellt. Es konnten mehrere Absorptionsmaxima detektiert werden. Die Zahlen im Elutionsprofil markieren die entnommenen Proben, welche mittels SDS-Gel analysiert wurden. Von den Fraktionen des ersten Maximums (58 ml) wurden die Proben 1 und 2 entnommen, um den Reinheitsgrad des Peaks zu überprüfen. Von den zwei folgenden Maxima bei 76 ml und 83 ml wurden die Proben 3 und 4 entnommen. Eine Überprüfung des letzten Maximums erfolgte nicht, weil hier die Absorption bei 260 nm höher war als bei 280 nm. Die Auswertung der Absorptionsmaxima mithilfe einer Kalibrierungskurve für die Chromatografie-Säule ergab, dass das erste Signal ein Protein mit einer Größe von 50 kDa darstellt, das zweite Signal ein 18 kDa und das dritte Signal ein 12 kDa großes Protein. Demnach stellt das erste Maximum Upd3 und das zweite Maximum Thioredoxin dar. Das dritte Maximum zeigt möglicherweise Fragmente an, welche durch unspezifische Spaltung entstanden sind. Auf einem SDS-Gel wurden die Spaltung und die Reinigung der einzelnen Spaltprodukte visualisiert (Abbildung 16). Dabei erschien das ungespaltene Fusionsprotein in einer Bande bei ungefähr 50 kDa. Die Probe des Spaltansatzes hingegen zeigt mehrere Banden, die eine Größe ab 35 kDa bis hin zu weniger als 14 kDa besitzen. In den Proben 1 und 2 ist jeweils eine Bande bei 35 kDa zu erkennen, welche der Größe des gespaltenen Upd3 entspricht. Diese Bande konnte hingegen nicht in den Proben 3 und 4 detektiert werden. In der letzten Spur konnte eine deutliche Bande bei 35 kDa detektiert werden. Hier wurden die Fraktionen des ersten Absorptionsmaximums vereint und konzentriert. Wie anhand des Chromatograms (Abbildung 16 A) und des SDS-Gels (Abbildung 16 B) ersichtlich wird, war die Ausbeute von Upd3 ohne tag sehr gering. Aufgrund dieser Tatsache wurde mit der Enterokinase-Spaltung nicht weiter

gearbeitet, sondern das gereinigte Fusionsprotein für die Produktion von Antikörpern genutzt und ein Upd3-Konstrukt ohne Thioredoxin-tag für die Strukturaufklärung hergestellt.

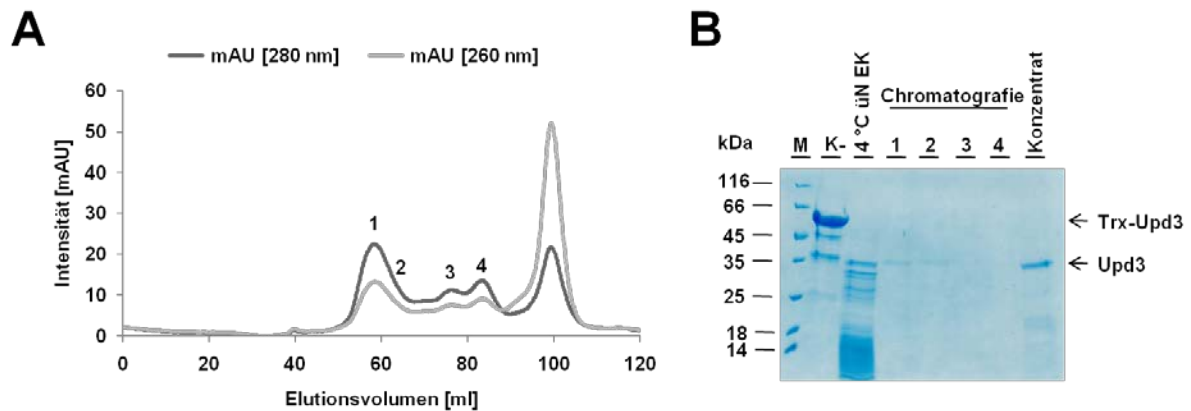


Abbildung 16: Reinigung des gespaltenen Trx-Upd3. Das Protein wurde mittels eines Äkta-System über eine Größenausschlusschromatografie-Säule gereinigt. Während des Laufs wurde die Absorption bei 280 nm und 260 nm detektiert. B) Auf dem SDS-Gel ist das ungespaltene Fusionsprotein, die Spaltprodukte, die einzelnen Proben des Chromatografielaufes und das Konzentrat, welches aus den Fraktionen des ersten Peaks entstand, zu erkennen. EK = Enterokinase, üN = über Nacht.

3.3.2 Monoklonale Antikörper gegen Upd3

3.3.2.1 Herstellung der Hybridomzellen

Die Herstellung der Hybridomzellen übernahm freundlicherweise Dr. Ahmad Trad (Biochemisches Institut, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel). Dafür wurden drei bis vier Monate alten Balb/c Mäusen Upd3 mit Thioredoxin-tag injiziert. Insgesamt wurden pro Maus 300 µg gereinigtes Trx-Upd3, verteilt auf fünf Tage, verabreicht. Nach 30 Tagen wurde den Mäusen die Milz entnommen, daraus wurden Zellen isoliert, welche mit Myelomzellen fusioniert wurden. Die fusionierten Zellen wurden für 10 Tage in Selektionsmedium (HAT-Medium) kultiviert und danach mittels ELISA auf die Produktion von α-Upd3-Antikörpern getestet. Dabei wurde getestet, ob die produzierten Antikörper nur an Upd3 mit Thioredoxin-tag oder auch an Thioredoxin allein binden. Drei Klone konnten selektiert werden, welche Trx-Upd3 aber nicht Thioredoxin detektierten. Diese drei Klone U31-1, U31-4 und U31-7 wurden isoliert und für die Antikörperproduktion kultiviert.

3.3.2.2 Test der α-Upd3-Antikörper

Die drei positiven Klone wurden mit Immunofluoreszenz (Dr. Henning Fedders, Zoologisches Institut, CAU Kiel), Western-Blot und Durchflusszytometrie auf ihre Funktionalität getestet.

Bei dem Western-Blot wurde der Überstand von Upd3-transfizierten HEK-293T-Zellen überprüft. Das Upd3-Konstrukt bestand ausschließlich aus dem vorhergesagten extrazellulären Teil, so dass von einer Sekretion des Proteins ausgegangen werden konnte. Die Western-Blots wurden mit den unterschiedlichen Antikörpern inkubiert und die Detektion erfolgte über die Verwendung eines sekundären POD-gekoppelten anti-Maus-Antikörpers. Der Antikörper U31-4 detektierte eine Bande zwischen 50 und 85 kDa, wohingegen die beiden anderen Antikörper keine Spezifität zeigten (Abbildung 17 A). Des Weiteren wurde getestet, ob der Antikörper U31-4 rekombinantes His-Upd3 detektieren kann. Auch hier konnte zwischen 35 und 50 kDa eine Bande detektiert werden.

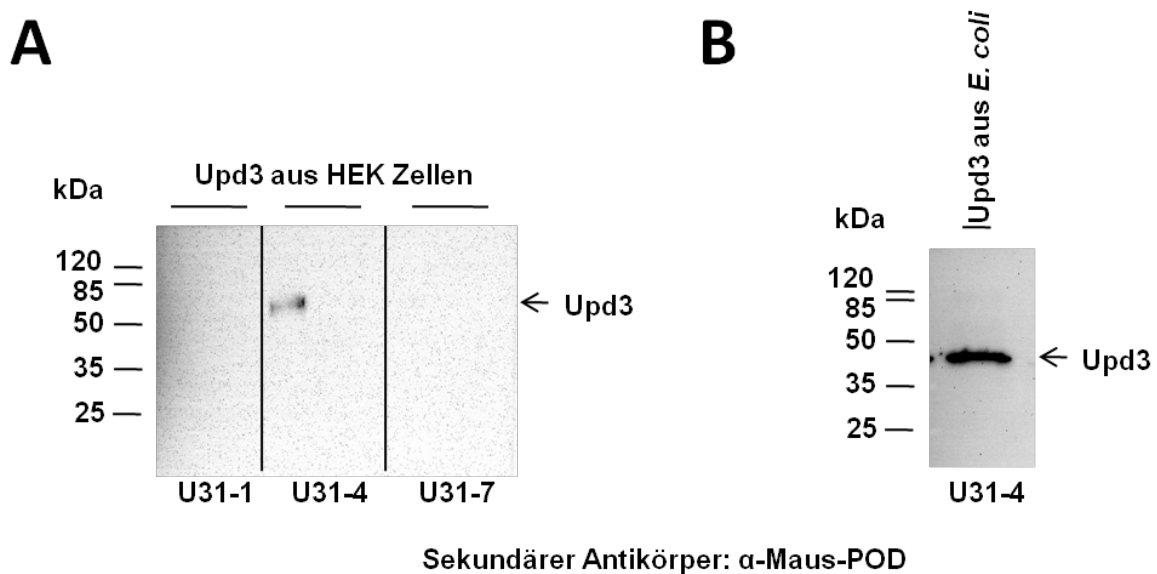


Abbildung 17: Antikörpertest mittels Western-Blot. A) Mit Überstand aus Upd3 transfizierten HEK-293T-Zellen wurden die drei Antikörper U31-1, U31-4 und U31-7 auf ihre Funktionalität getestet. B) Mit U31-4 wurde getestet, ob rekombinant hergestelltes Upd3 aus dem *E. coli* Stamm BL21 detektiert werden kann.

Der Antikörper U31-7 eignete sich für Immunofluoreszenz-Färbungen (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dessen wurde dieser Antikörper auch hinsichtlich seiner Eignung für die Durchflusszytometrie getestet. Hierfür wurden HEK-293T-Zellen mit den Konstrukten Upd3 ohne tag und HA-Upd3-GFP transfiziert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass das Maximum der Kurve der transfizierten Zellen sowohl bei Upd3 als auch bei HA-Upd3-GFP im Vergleich zu den untransfizierten Wildtyp-Zellen nach rechts verschoben ist. Das bedeutet, dass die transfizierten Zellen im Gegensatz zu den Wildtyp-Zellen gefärbt wurden. Demnach kann der Antikörper des Klons U31-7 Upd3 in der Durchflusszytometrie detektieren.

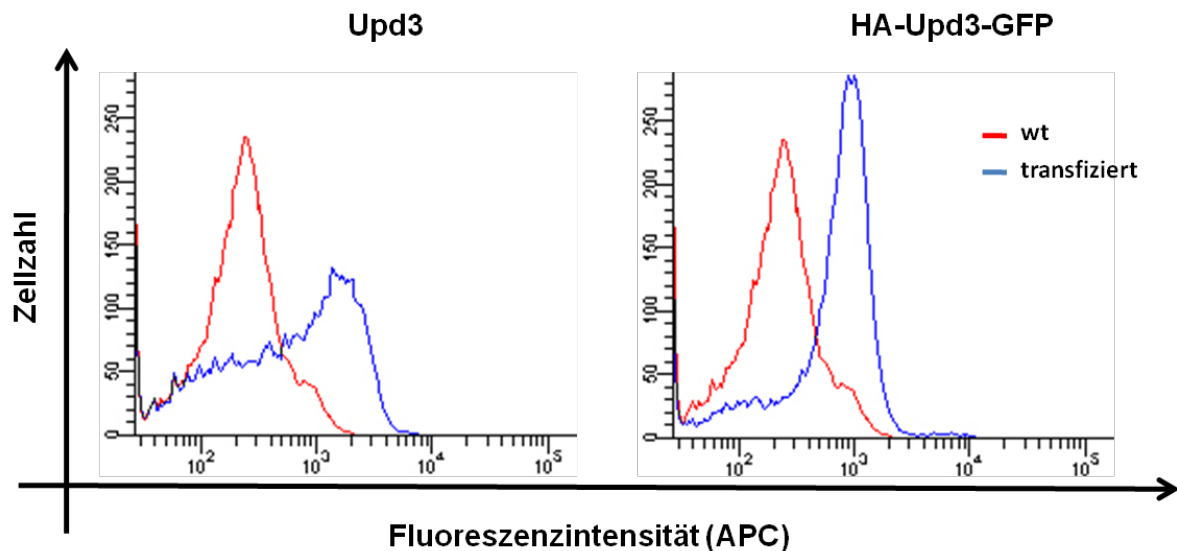


Abbildung 18: Durchflusszytometrie mit HEK-293T-Zellen. Bei dem Versuch wurden die Zellen mit zwei unterschiedlichen Konstrukten transfiziert, Upd3 ohne *tag* und Upd3 mit GFP fusioniert und HA-*tag*. Die Ordinate zeigt die Anzahl der gemessenen Zellen an und die Abzisse, mit welcher Intensität die Zellen fluoreszieren. Mit der roten Kurve ist der Verlauf der Wildtyp-Zellen dargestellt und mit der blauen Kurve die transfizierten Zellen (links mit Upd3 transfiziert und rechts mit HA-Upd3-GFP). Die Zellen wurden mit dem Antikörper-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff Allophycocyanin (APC) gefärbt Primärer Antikörper U31-7, sekundärer Antikörper α -Maus-APC-Ak.

3.3.2.3 Reinigung von anti-Upd3-Antikörpern

Die Antikörper wurden aus dem Überstand der Hybridomzellen mithilfe einer Protein-G-Säule gereinigt. In Abbildung 19 ist zu erkennen, dass bei den ersten 40 ml eine hohe Absorption bei 280 nm detektiert werden konnte. Dies ist mit der hohen Menge von Protein, welches sich in dem Überstand befand und nicht an die Protein-G-Säule gebunden hat, zu erklären. Nach 40 ml sank die Absorption ab und nach 49 ml wurden die Antikörper eluiert. Die Antikörper wurden in PBS bei -80 °C gelagert. Bei dieser Reinigung konnten 4.5 ml Antikörperlösung mit einer Konzentration von 0.5 mg/ml aus ca. 200 ml Überstand gewonnen werden. Bei einer zweiten Reinigung wurden aus 550 ml Überstand 6 ml Antikörperlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml gewonnen. Es wurden einzig die Antikörper des Klon U31-7 gereinigt. Für die Western-Blots wurde während der gesamten Arbeit das konditionierte Medium der Hybridomzellen (Klon U31-4) verwendet.

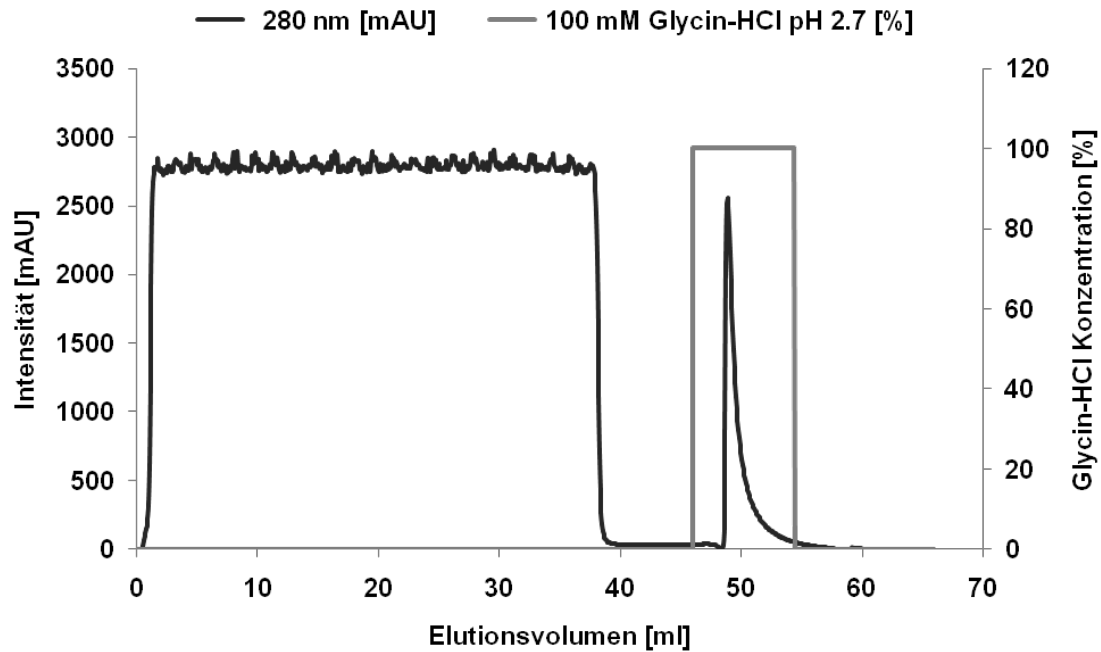


Abbildung 19: Reinigung des Antikörpers U31-7 mittels Affinitäts-Chromatografie. Der Antikörper wurde aus 40 ml konzentriertem Medium der Hybridomzellen mittels einer Protein-G-Säule gereinigt. Die Reinigung wurde mithilfe eines Äkta-Systems dokumentiert. Bei 280 nm wurden die in dem Überstand befindlichen Proteine detektiert (schwarze Linie). Die Antikörper wurden mittels Glycin-HCl eluiert. Die graue Linie zeigt die Glycin-HCl Konzentration an.

3.3.3 Reinigung des Upd3 mit N-terminalem His-*tag*

3.3.3.1 His-Upd3-Konstrukt

Rekombinantes His-Upd3 wurde für die Strukturaufklärung hergestellt. Da sich Trx-Upd3, wegen des schwer zu entfernenden Thioredoxin-*tags* nicht für die Strukturaufklärung eignete, wurde ein neues Konstrukt erstellt. Wie beim vorherigen Konstrukt wurde nur der vorhergesagte extrazelluläre Teil verwendet, wobei diesmal der vorhergesagte N-terminale *loop* weggelassen wurde (Abbildung 20). Die Sequenz begann demnach direkt mit einem helikalen Bereich und wurde in den Vektor pET28a kloniert, welcher einen His-*tag* besaß. In dem folgenden Abschnitt wurde für dieses Konstrukt ausschließlich die Bezeichnung His-Upd3 verwendet (Abbildung 21 A).

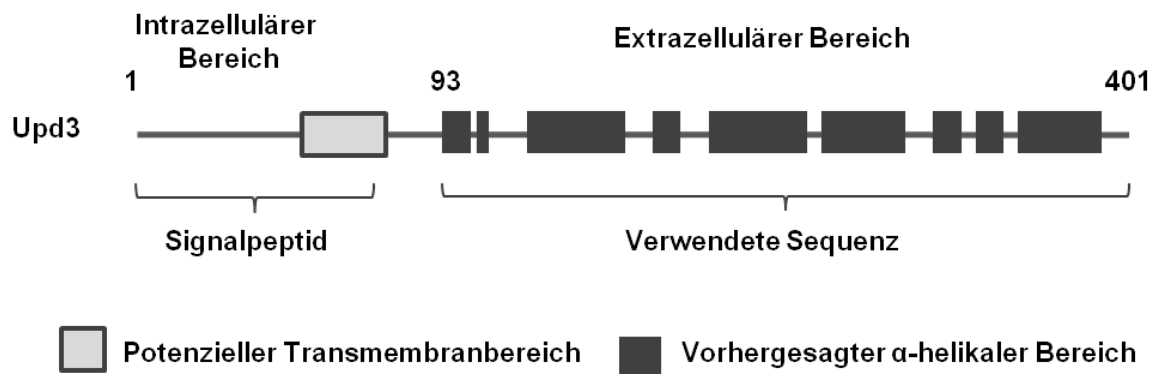


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Upd3-Sequenz mit der Sequenz, die für His-Upd3 verwendet wurde. Zu sehen ist Upd3 in voller Länge mit dem vorhergesagten Signalpeptid und der verwendeten Sequenz von dem 93. bis zur 401. Aminosäurerest. His-Upd3 besteht aus dieser Sequenz und einem N-terminalen His-tag.

3.3.3.2 Expression von His-Upd3

His-Upd3 konnte als lösliches Protein und als IBs in dem *E.coli* Stamm BL21 exprimiert werden. Die Expression von löslichem His-Upd3 wird hier nicht weiter beschrieben, da sich nach der Reinigung des Proteins eine große Menge DNA in der Probe befand und diese nicht entfernt werden konnte. Die Expression wurde unter denselben Bedingungen wie von Trx-Upd3 durchgeführt. In Abbildung 21 B ist ein SDS-Gel dargestellt, auf dem die Proben vor der Induktion und 3 h nach der Induktion der Expression zu sehen sind. Es ist deutlich zu erkennen, dass bei der Probe nach der Induktion eine Bande zwischen 35 und 45 kDa detektiert wurde, welche dem Zielprotein entspricht.

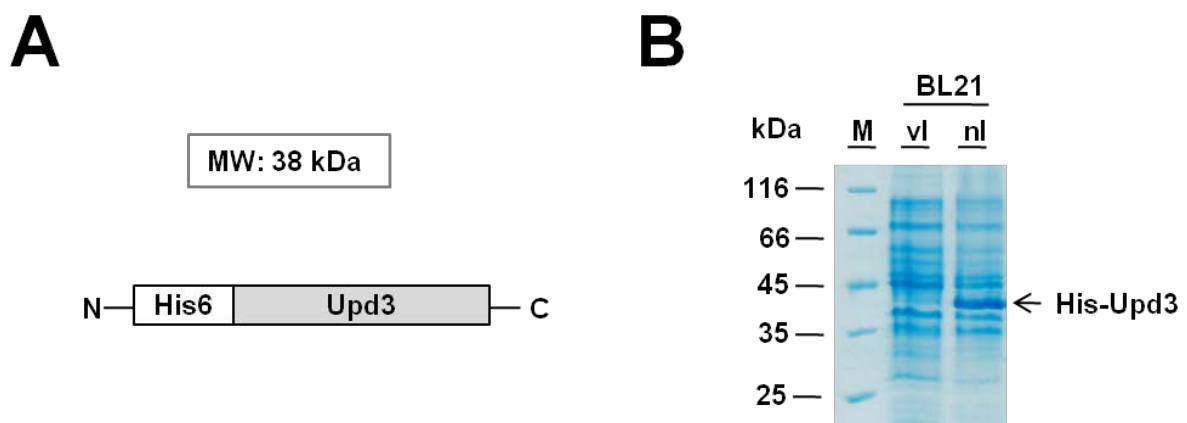


Abbildung 21: Schematische Darstellung des His-Upd3-Konstrukts und Expression von His-Upd3. A) Der extrazelluläre Abschnitt von Upd3 mit einem N-terminalen His-tag. B) Die Expression wurde in dem *E.coli*-Stamm BL21 durchgeführt und mittels SDS-PAGE analysiert. M = Größenstandard, vl = vor Induktion, nl = nach Induktion, MW = Molekulargewicht, N = Amino-Terminus, C = Carboxy-Terminus.

3.3.3.3 Reinigung von His-Upd3 aus IBs

His-Upd3 wurde in Form von *inclusion bodies* in Denaturierungspuffer inkubiert, mittels einer Ni-NTA-Agarosematrix gereinigt und anschließend über Nacht renaturiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Konzentration von denaturiertem His-Upd3 bei 0.3 µg/µl lag. Das Protein wurde mittels Größenausschlusschromatografie aus dem Dialysat gereinigt (Abbildung 22 A). Nach 58,4 ml konnte ein Absorptionsmaximum detektiert werden. Anhand der Kalibrierungskurve wurde errechnet, dass sich in der Probe des Maximums ein Protein mit einer Größe von 50 kDa befand. Diese Probe wurde mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 22). Auf dem SDS-Gel konnte eine Bande zwischen 35 und 45 kDa detektiert werden. Mithilfe eines Western-Blots mit der gleichen Probe und einem Antikörper gegen Upd3 konnte gezeigt werden, dass es sich bei dieser Bande um Upd3 handelt. Das bedeutet, dass His-Upd3 als monomeres Protein gereinigt werden konnte.

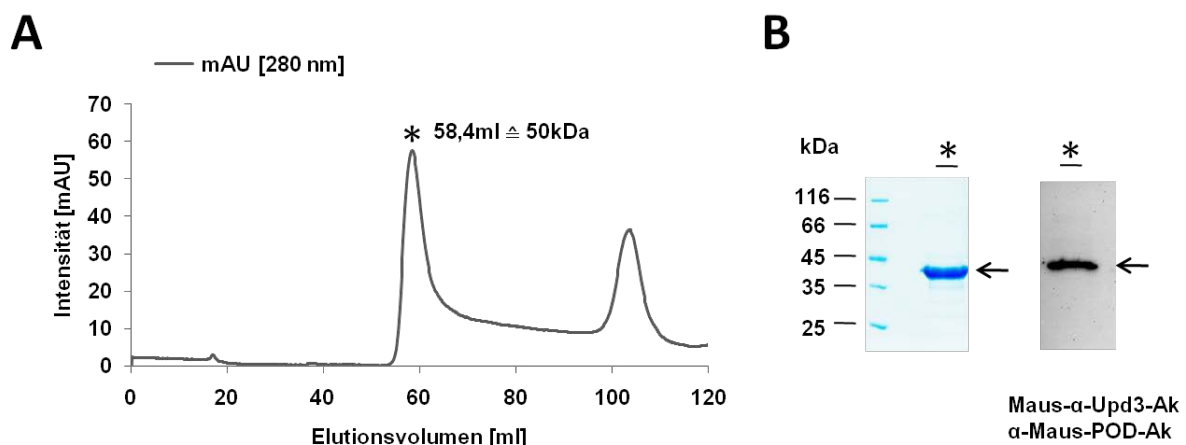


Abbildung 22: Reinigung von His-Upd3 mittels Größenausschlusschromatografie. A) Reinigungsverlauf von His-Upd3 bei dem eine Superdex75 16/60-Säule und ein Laufpuffer mit 20 mM Tris pH 8.0 mit 500 mM NaCl verwendet wurde. B) Gereinigtes His-Upd3 wurde mittels Coomassie Färbung und Western-Blot nachgewiesen. POD = Peroxidase, Ak = Antikörper.

3.3.4 Luciferase-Test

3.3.4.1 Aktivitätstest mit Trx-Upd3 und His-Upd3

Um zu überprüfen, ob das gereinigte Protein den Jak/Stat-Signalweg aktivieren kann, wurde ein Luciferase-Test durchgeführt. Dafür wurden Kc167-Zellen in einer 6-Lochplatte mit den Vektoren Act-Renilla und 10xStat92E-Luciferase transfiziert. Bevor mit den eigentlichen Versuchen begonnen werden konnte, wurde überprüft in welchem Verhältnis die beiden Vektoren transfiziert werden sollten. Dafür wurden Kc167-Zellen mit den beiden Vektoren im

Verhältnis von 1:2; 1:10 und 1:20 transfiziert, wobei Act-Renilla immer im Überschuss verwendet wurde. Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen mit gereinigtem Upd3 aus HEK-293T-Zellen stimuliert. Für diesen ersten Test stand noch kein gereinigtes Trx-Upd3 oder His-Upd3 zur Verfügung. 24 h nach der Stimulierung wurden die Zellen lysiert. Das Lysat wurde mit Substrat für die Firefly-Luciferase versetzt. Die Aktivität wurde gemessen und anschließend wurde ein Stop-Puffer und Substrat für die Renilla-Luciferase zugegeben. Nun wurde, zur Kontrolle, die Aktivität der Renilla-Luciferase gemessen. Anhand der Ergebnisse wurde festgestellt, dass die Aktivität beider Luciferasen bei einem Verhältnis von 1:10 (10xStat92E-Luciferase zu Act-Renilla) am höchsten war (Daten nicht gezeigt). Demnach wurden die Zellen in allen folgenden Luciferase-Tests mit den Vektoren in einem Verhältnis von 1:10 transfiziert. Für den Aktivitätstest von Trx-Upd3 und His-Upd3 wurden die mit den Luciferase-Vektoren transfizierten Zellen auf einer 6-Lochplatte mit je einem der zwei Upd3-Varianten stimuliert. Die Zellen wurden nach 24 h lysiert und das Lysat analysiert, wobei die Renilla- und Firefly-Aktivitäten ins Verhältnis gesetzt wurden. In Abbildung 23 ist das Ergebnis des Aktivitäts-Assays mit Trx-Upd3 und His-Upd3 stimulierten Zellen zu sehen. Dabei ist die Luciferaseaktivität in % dargestellt, welche aus dem Verhältnis von Firefly-Luciferaseaktivität zu Renilla-Luciferaseaktivität errechnet wurde. Bei den Lysaten der nicht stimulierten Zellen konnte eine Luciferaseaktivität von 20 % bis 30 % errechnet werden. Bei den stimulierten Zellen waren es hingegen 90% bis 100 %. Anhand der Ergebnisse konnte festgestellt werden, dass die Stimulierung der Zellen durch Trx-Upd3 und durch His-Upd3 zu einer Steigerung der Luciferaseaktivität führte.

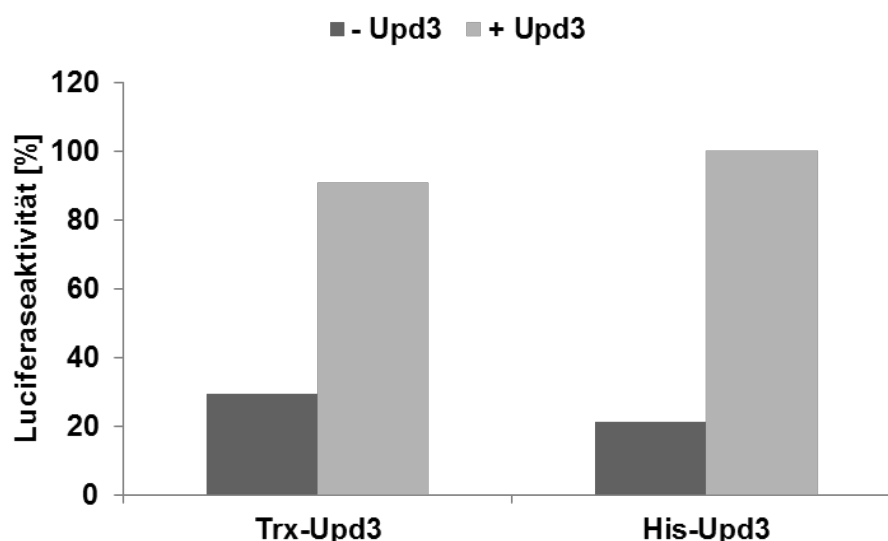


Abbildung 23: Aktivitätstest von Trx-Upd3 und His-Upd3. Mit Luciferase transfizierte Zellen wurden mit gereinigtem rekombinanten Protein stimuliert. Trx-Upd3 wurde mit einer Konzentration von 2.4 μ M und His-Upd3 mit einer Konzentration von 1.6 μ M eingesetzt. Als Kontrolle (-Upd3) diente der Puffer in dem sich die Proteine befanden (20 mM Tris pH 8, 500 mM NaCl). Die Zellen wurden in Medium mit 0.5 % FCS stimuliert.

3.3.4.2 Aktivitätstest mit His-Upd3

Um die Fähigkeit von His-Upd3 den Jak/Stat-Signalweg aktivieren zu können weiter zu analysieren, wurden Kc167-Zellen mit den Vektoren Act-Renilla und 10xStat92E-Luciferase transfiziert und diese mit unterschiedlichen Konzentrationen von gereinigtem His-Upd3 stimuliert. 24 Stunden nach der Stimulierung wurden die Zellen lysiert und das Lysat für den Luciferase-Test (Dual Luciferase Reporter Assay, Promega) verwendet. Bei dem Lysat der nicht-stimulierten Zellen konnte eine Luciferaseaktivität von 35 % gemessen werden. Bei einer Stimulierung der Zellen mit 78 nM His-Upd3 verdoppelte sich die Luciferaseaktivität und bei 780 nM His-Upd3 wurde die höchste Luciferaseaktivität gemessen (100 %). Die Luciferaseaktivität blieb bei einer Inkubation mit 1570 nM His-Upd3 auf 95 %. Die Ergebnisse zeigen, dass die Aktivität von His-Upd3 mit der Konzentration stieg, jedoch nur bis zu einer bestimmten Konzentration. Nach ungefähr 780 nM blieb die Aktivität konstant (Abbildung 24).

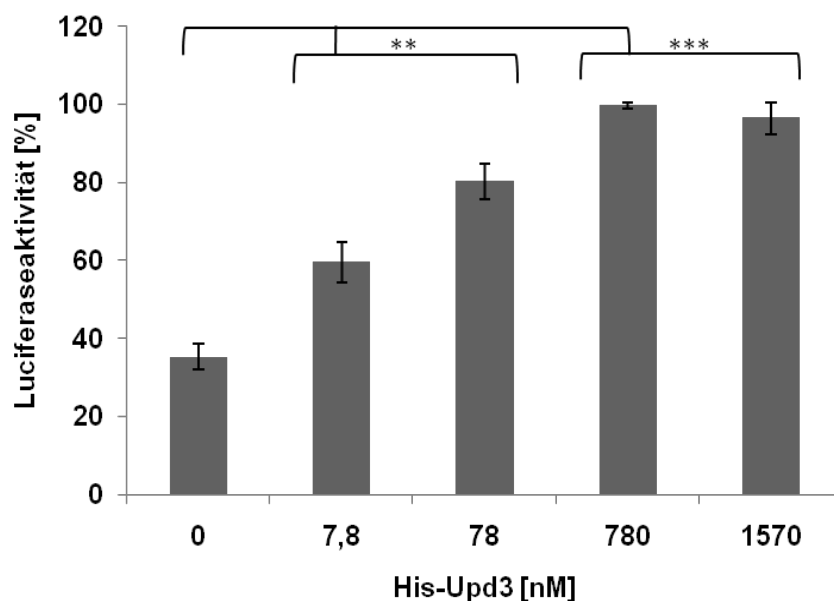


Abbildung 24: Aktivitätstest mit gereinigtem His-Upd3 mittels Luciferase-Test. Die Stimulierung der Luciferase-transfizierten Zellen erfolgte mit unterschiedlichen Konzentrationen von His-Upd3. Das Protein befand sich in einem Tris-Puffer (pH 8.0) mit 500 mM NaCl. Die Zellen wurden während der Stimulierung in Medium mit 0.5 % FCS inkubiert. $p < 0.05$ = *; $p < 0.005$ = **; $p < 0.0001$ = ***

3.3.5 Untersuchungen zur Struktur von His-Upd3

3.3.5.1 Zirkulardichroismus

Mittels Zirkulardichroismus (CD) wurde das Vorhandensein von Sekundärstrukturen in His-Upd3 untersucht. Das Protein wurde in zwei unterschiedlichen Puffern gemessen. Die

erhaltenen Spektren zeigen Absorptionsminima bei 222 nm und 208 nm, sowie ein Absorptionsmaximum bei 195 nm, wie es für α -helikale Proteine charakteristisch ist. Es ist zu erkennen, dass sich die beiden Spektren nur in der Signalstärke unterscheiden (Abbildung 25). Von dem gereinigten His-Upd3 wurde zusätzlich die thermische Stabilität untersucht. Dafür wurde die Elliptizität des Proteins bei einer Wellenlänge von 222 nm in dem Temperaturbereich von 20 °C bis 80 °C gemessen. His-Upd3 befand sich dabei in 50 mM NaOAc (pH 5). Auf der Abbildung 26 A ist zu erkennen, dass die Elliptizität ab 37 °C stieg. Bei 50 °C wurde eine maximale Steigung erreicht und die Elliptizität blieb konstant. Diese Kurve zeigt, dass sich His-Upd3 aufgrund des Temperaturanstiegs entfaltete. Die Schmelztemperatur von His-Upd3 lag bei etwa 41 °C. Bevor His-Upd3 erhitzt wurde und nachdem es erhitzt und wieder abgekühlt wurde, erfolgte eine Messung des Proteins bei 20 °C zwischen 210 und 250 nm (Abbildung 26 B). Die beiden Spektren unterschieden sich nur geringfügig. So ist zu erkennen, dass His-Upd3 reversibel durch Hitze denaturiert werden kann.

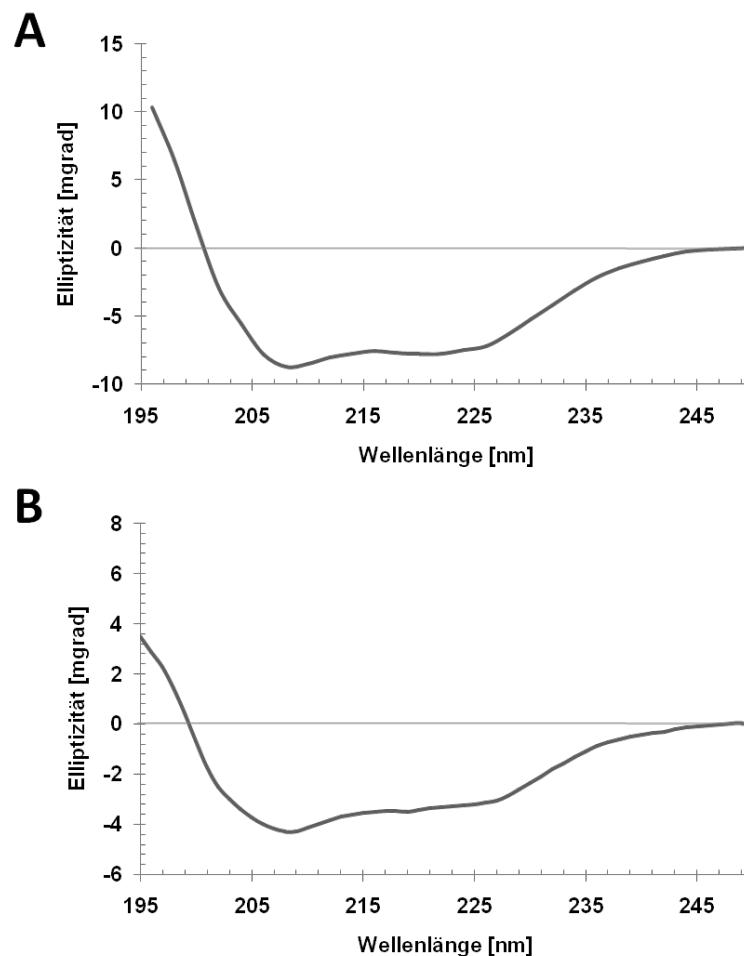


Abbildung 25: Die Sekundärstruktur von His-Upd3 wurde mittels Zirkulardichroismus untersucht. A) Zu sehen sind Spektren bei dem die Elliptizität von His-Upd3 in dem Bereich zwischen 195 nm und 250 nm detektiert wurde. A) Das Protein befand sich in einem Tris-Puffer (pH 8) mit 500 mM NaCl. B) His-Upd3 wurde in 50 mM NaOAc (pH 5) gemessen.

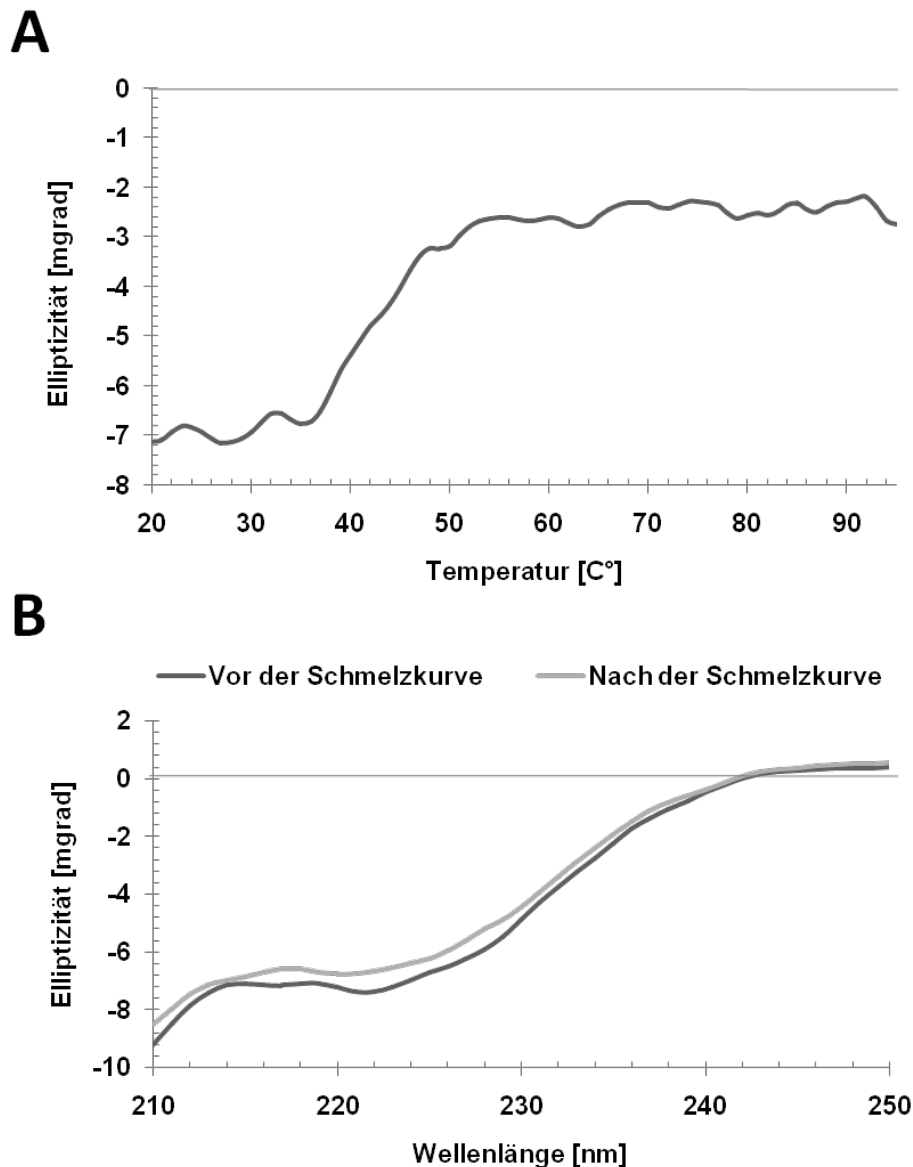


Abbildung 26: Thermische Stabilität von His-Upd3. Die Analysen von His-Upd3 wurden in 50 mM NaOAc (pH 5) durchgeführt. A) Die Schmelzkurve wurde mithilfe des CD-Spektrometers bei 222 nm gemessen. B) Vor dem Erhitzen und nach dem Abkühlen wurde von His-Upd3 ein CD-Spektrum zwischen 210 nm und 250 nm gemessen.

3.3.5.2 Dynamische Lichtstreuung

Mit der Dynamischen Lichtstreuung (DLS) wurde gemessen, ob His-Upd3 als Monomer vorliegt oder ob sich Aggregate gebildet haben. Um gleiche Bedingungen wie bei der NMR-Messung zu schaffen, wurde der Puffer zu 50 mM NaOAc pH 5 ausgetauscht. Dieser Puffer wurde gewählt, weil er für NMR-Messungen geeignet ist. Die Messungen zeigten einen Radius zwischen 1 und 10 nm (Abbildung 27). Die Probe war monodispers. Die vom

Programm errechnete Größe der gemessenen Moleküle betrug 60 kDa. Die Autokorrelationskurve zeigt, dass die Probe homogen und frei von störenden Partikeln war.

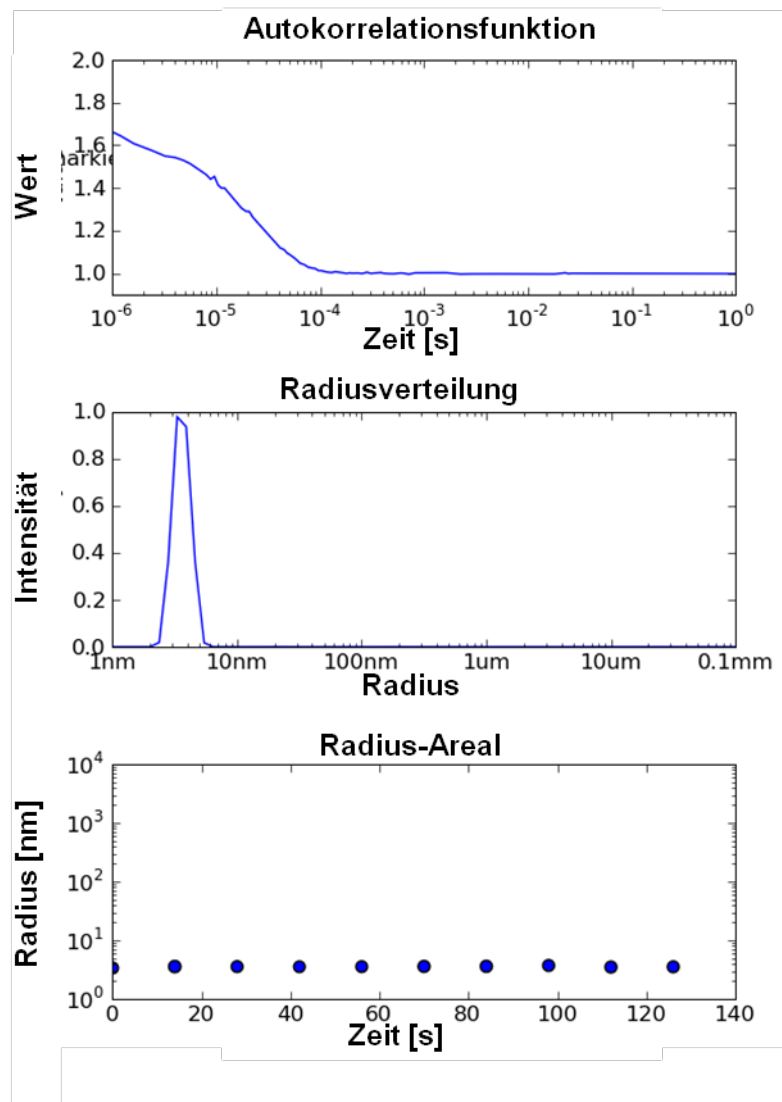


Abbildung 27: Untersuchung von His-Upd3 mit Dynamischer Lichtstreuung. Dargestellt ist die Autokorrelationskurve, welche die Konstanz der Messungen widerspiegelt. Die Radiusverteilung stellt den durchschnittlichen Radius von His-Upd3 dar. Bei dem Radius-Areal ist der Radius von His-Upd3 von 10 Messungen innerhalb von 140 s dargestellt. Das Protein befand sich während der Messung in 50 mM NaOAc, pH 5.

3.3.5.3 Analyse der Disulfidbrücken

Des Weiteren wurde untersucht, welche Cysteinreste miteinander verbunden sind. His-Upd3 besitzt vier Cysteinreste, demnach bestehen verschiedene Möglichkeiten, wie diese miteinander verbunden sein könnten. Für diese Untersuchung wurde das in dem Puffer befindliche Natriumchlorid von gereinigtem His-Upd3 mittels einer Sepax-Säule entfernt. Das Protein wurde anschließend lyophilisiert und von Dr. Chien-Wen Hung (Arbeitsgruppe Prof.

Dr. Andreas Tholey, Institut für experimentelle Medizin, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) zur Analyse der Disulfidbrücken verwendet. Dabei wurde herausgefunden, dass eine Disulfidbrücke zwischen den Aminosäureresten Cys¹²⁹ und Cys³⁸⁷ besteht, wohingegen Cys¹⁴⁶ und Cys²⁷¹ in ihrer reduzierten Form vorlagen.

3.3.5.4 Mehrdimensionale NMR-Spektroskopie

Für die NMR-Messungen wurde ¹³C-, ¹⁵N-Isotopen-markiertes His-Upd3 hergestellt. Die Markierung des Proteins erfolgte durch die Expression in Minimalmedium, welches ¹³C-Glukose und ¹⁵N-Ammoniumchlorid als einzige Kohlenstoff- bzw. Stickstoffquelle enthielt. Nach der Reinigung des markierten His-Upd3 befand sich das Protein in einem Puffer mit 500 mM NaCl. Eine derart hohe Ionenstärke macht eine Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) -Messung unmöglich, weshalb andere Pufferbedingungen ausprobiert wurden. Der Puffer wurde mithilfe einer Nap-Säule ausgetauscht. Mit den Puffern A (20 mM Tris pH 8 mit 250 mM NaCl) und B (20 mM Tris pH 8 mit 500 mM KCl) konnte kein positives Ergebnis erzielt werden. Erst der Austausch des Puffers zu 50 mM NaOAc, pH 5.0 ermöglichte eine NMR-Messung von His-Upd3. Die NMR-Spektren zeigten Signale, wobei die Dispersion der Resonanzen sehr gering war. In dem Spektrum (Abbildung 28) sind Signale in Bereichen erkennbar, in denen sich erfahrungsgemäß die Signale der Tryptophan-Seitenketten (A), Glycinreste (C) und der Arginin-, Asparagin-, Glutamin- und Lysinreste (D) befinden. Die restlichen Signale konzentrierten sich in Hinblick auf die Amidprotonen zwischen 7.9 und 8.5 ppm (B), was aufgrund der vorhergesagten α -helikalen Struktur zu erwarten war.

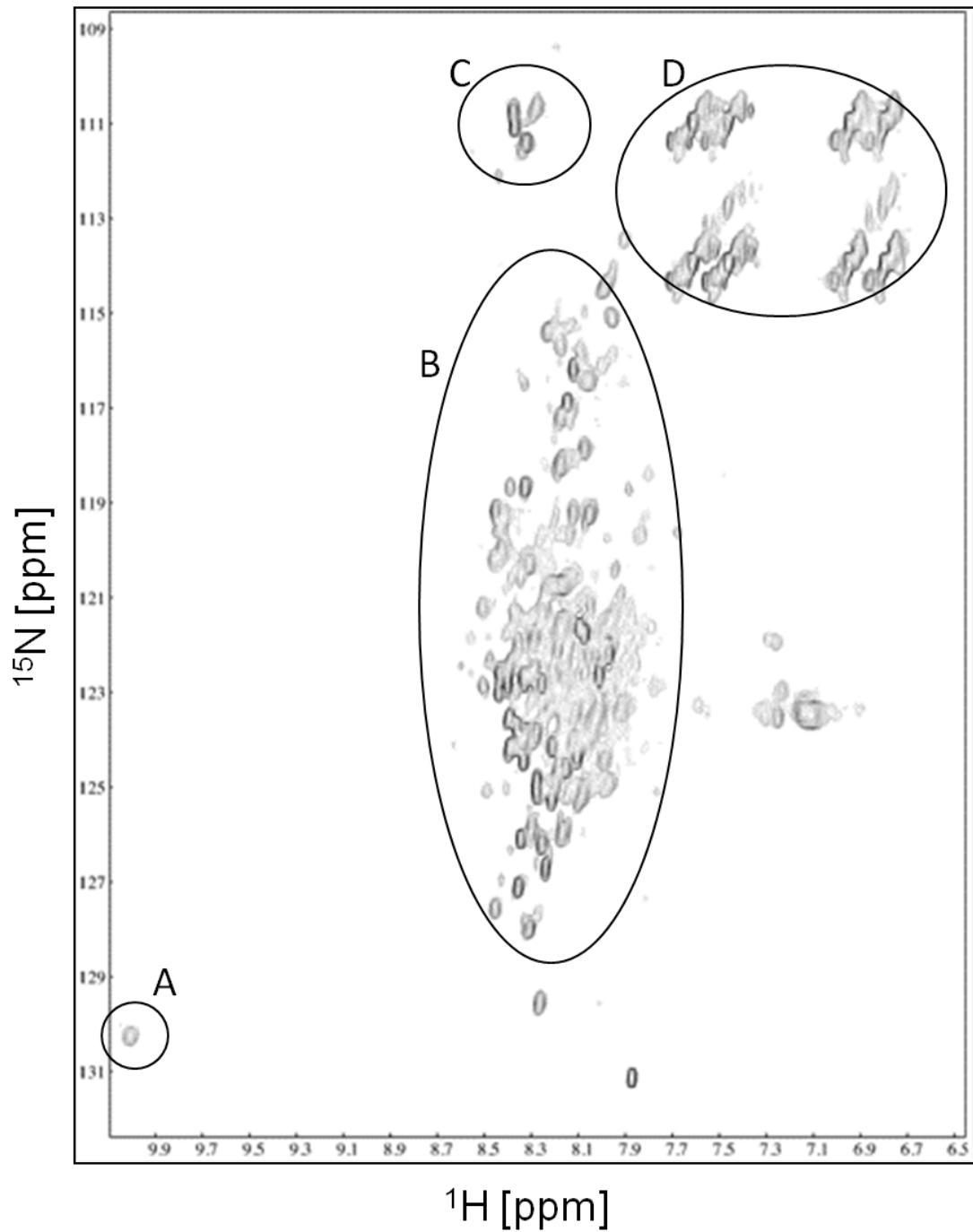


Abbildung 28: ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum von ^{13}C und ^{15}N -markiertem His-Upd3. Zu sehen ist ein ^{15}N -HSQC-TROSY Spektrum gemessen mit *transverse relaxation optimized spectroscopy* (TROSY). In den markierten Bereichen befinden sich erfahrungsgemäß die Signale der Tryptophan-Seitenketten A) der Glycinreste C) und der Aminogruppe aus den Seitenketten D). Die meist überlappenden Resonanzen befinden sich in einem Bereich der für eine α -helikale Struktur typisch ist A).

4 Diskussion

4.1 Strukturelle Charakterisierung von Upd3

Mit Beginn der Arbeit war bekannt, dass Upd3 den Jak/Stat-Signalweg bei *Drosophila* aktiviert (Agaisse, Petersen et al. 2003; Wright, Vogt et al. 2011). Über die Struktur des Zytokin-ähnlichen Proteins war jedoch nur wenig beschrieben. Sekundärstruktur- und Signalpeptidvorhersagen ergaben, dass Upd3 möglicherweise ein α -helikales Protein ist, welches kein Signalpeptid besitzt. Andererseits wurde gezeigt, dass Upd3 sekretiert wird und dass es an der extrazellulären Matrix (EZM) assoziiert ist. Die Löslichkeit des sekretierten Proteins konnte durch die Zugabe von Heparin gesteigert werden (Wright, Vogt et al. 2011). Die Vorhersagen der Programme „Phobius“ und „SignalP“ konnten diese These bestätigen. Einzig das Programm „PrediSi“ zeigte eine Schnittstelle für die Abspaltung eines Signalpeptids nach dem 65. Aminosäurerest (Daten nicht gezeigt). Die Länge dieses Signalpeptides ist jedoch ungewöhnlich, zudem befindet sich diese potentielle Schnittstelle im Zentrum eines hydrophoben Bereichs. Dem entgegen wird bei einer klassischen Signalsequenz der hydrophobe Bereich von positiven und polaren Aminosäuren flankiert. Die Sekundärstrukturvorhersagen mittels „PredictProtein“ und „Jpred“ gaben ein α -helikales Protein mit vier längeren und sechs kürzeren Helices an. Die N-terminal gelegene Helix wurde von „PredictProtein“ als transmembrane Helix identifiziert, was die These, dass Upd3 einen transmembranen Bereich besitzt, untermauert. Diese These sollte mittels Durchflusszytometrie und der Analyse isolierter Membranen bestätigt werden. Dafür wurden HEK-293 T und S2 Zellen mit der DNA eines Upd3-Konstrukts transfiziert, welches N-terminal einen HA-*tag* besaß und C-terminal GFP markiert war.

Mittels der Durchflusszytometrie wurde zunächst gezeigt, dass Upd3 auf der Oberfläche von HEK-293 T und S2 Zellen lokalisiert ist. In intakten Zellen, welche mit HA-Upd3-GFP-DNA transfiziert waren, konnte mittels nur der C-terminal befindliche GFP-*tag* an der Zelloberfläche detektiert werden. Dies ließ darauf schließen, dass sich der C-Terminus des Proteins außerhalb der Zelle befindet, jedoch nicht, ob das Protein integral oder peripher mit der Zellmembran verbunden ist. Um dies zu analysieren wurde im Folgenden untersucht wo sich der N-terminale HA-*tag* befindet. Die Versuche ergaben, dass der N-terminale Teil intrazellulär in permeabilisierten Zellen, jedoch nicht extrazellulär in nicht behandelten Zellen nachgewiesen werden konnte. Dies unterstützt die Theorie, dass Upd3 ein Typ-II-Transmembranprotein ist, mit einem intrazellulären N-Terminus und einem extrazellulären C-Terminus.

Die Lokalisierung von Upd3 wurde zudem von Dr. H. Fedders mittels Immunofluoreszenz untersucht (Abbildung 29). Dafür wurden S2-Zellen mit HA-Upd3 transfiziert und die

Lokalisierung des N- und C-Terminus mittels α -HA-Ak und α -Upd3-Ak detektiert. Dabei konnte der N-terminale HA-*tag* in der gesamten Zelle detektiert werden, Upd3 hingegen nur in Bereichen die der Färbung nach, dem Golgi-Apparat entsprechen. Die Lage des N-terminalen HA-*tags* konnte jedoch aufgrund fehlender Co-Färbungen des endoplasmatischen Retikulums (ER) und des Golgi-Apparates nicht eindeutig geklärt werden. Eine Vermutung war, dass der HA-*tag* im ER detektiert wurde, wobei sich das ER dann in der gesamten Zelle befand. Daraus ließ sich schließen, dass der N-Terminus intrazellulär detektiert werden konnte. Jedoch konnte nicht gewährleistet werden, dass er noch mit Upd3 fusioniert war. Allerdings blieb offen, warum der HA-*tag* nach seiner Abspaltung vom restlichen Protein nicht abgebaut wurde. Für ein aussagekräftiges Ergebnis müssten entsprechende Co-Färbungen der zellulären Kompartimente erfolgen. Zudem konnte im Gegensatz zur Durchflusszytometrie kein Upd3 mittels der Immunfluoreszenzfärbung detektiert werden. Dies kann darin begründet liegen, dass sie eine Methode mit geringer Sensitivität ist. Eine Erklärung für die Trennung des N-Terminus vom restlichen Protein wäre, dass Upd3 als Transmembranprotein synthetisiert wird, jedoch der größte Anteil schon in der Zelle im ER oder im Golgi von der Membran gespalten wird, so dass nur ein geringer Anteil, der mittels Fluoreszenzfärbung nicht detektierbar ist, erst an der Zelloberfläche gespalten wird. Dies würde die Präsenz des N-terminalen HA-*tags* im ER und des Upd3 im Golgi erklären. Wobei ein Verbleib des N-terminalen Teils des Proteins in der Membran unwahrscheinlich erscheint, da dieser nach der Spaltung abgebaut werden sollte. Der HA-*tag* dürfte demnach nach dem Abbau nicht mehr detektierbar sein. Wird der *tag* jedoch aufgrund einer vorhandenen Signalsequenz abgespalten und Upd3 als membranassoziertes Protein sekretiert, sollte auch hier der *tag* nicht detektierbar sein bzw. nicht in dem Maße, weil Signalpeptide nach der Spaltung für gewöhnlich abgebaut werden. Eine Möglichkeit wäre jedoch, dass der N-terminale Teil des Proteins auf Grund des *tags* nicht korrekt abgebaut wird. Die unterschiedliche Lokalisierung von Upd3 und HA-*tag* bleibt ungeklärt, kann jedoch allein nicht als Beweis für ein sekretorisches Protein angesehen werden.

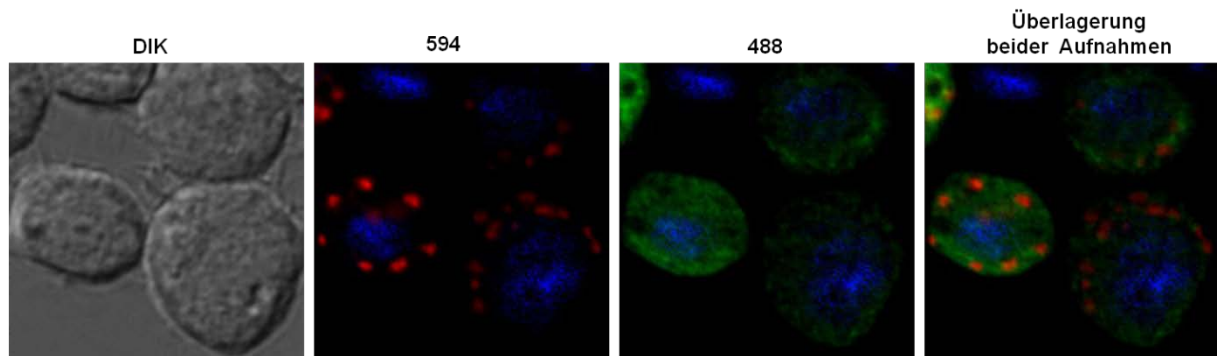


Abbildung 29: Immunfluoreszenzaufnahmen von Upd3-transfizierten Drosophilazellen. In den Zellen konnte mittels Kofärbung Upd3 durch U31-7 und DyLight 594-gekoppeltes Ziege-anti-Maus IgG (rot) sowie der HA-tag durch Kaninchen-anti-HA-IgG und DyLight 488-gekoppeltes Ziege-anti-Kaninchen-IgG (grün) detektiert werden. Die Färbung des Zellkerns erfolgte mit Höchst (blau). Für die Aufnahmen wurde ein „Zeiss Axio Imager Z1 mit ApoTome“ verwendet. Durch das Apotome wurden überstrahlungsfreie optische Schnitte erlangt, die wiederum zu einem Bild überlagert wurden.

Der Durchflusszytometrie-Versuch, bei dem untersucht wurde, ob Upd3 durch hohe Ionenstärke von den Zellen abgelöst werden kann, fiel negativ aus. Demnach konnte Upd3 nicht über Ionenbindungen mit der Membran assoziiert sein. Durch Inkubation der Zellen mit Trypsin konnte Upd3 jedoch von der Zellmembran abgespalten werden. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass nur die GFP-Markierung abgespalten wurde und Upd3 demnach nicht mehr detektiert werden konnte und somit noch an der Membran assoziiert vorliegt. Eine andere Möglichkeit wäre die Bindung von Upd3 an die Zellmembran über Glykosaminglykane, wie Heparansulfat. In diesem Fall sollte Upd3 durch die Inkubation mit freiem Heparin von der Membran abgelöst werden (Harrison, McCoon et al. 1998). In der Tat ließ sich Upd3 scheinbar mit Heparin von HEK-293T- und S2-Zellen lösen, wobei jedoch nie die gesamte Menge von Upd3 abgelöst werden konnte. Auch eine Steigung der Heparinkonzentration führte nicht zu einer geringeren Menge an Zell-gebundenem Upd3 (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieser Ergebnisse besteht die Möglichkeit, dass Upd3 zumindest teilweise ohne Membranverankerung an der Membran assoziiert vorliegt (Abbildung 29). Diese Ergebnisse gehen damit konform, dass beschrieben wurde, dass Upd3 über Glykosaminoglykane mit der EZM assoziiert ist, aber auch als lösliches Protein detektiert wurde, dessen Menge durch die Zugabe von Heparin erhöht werden konnte (Wright, Vogt et al. 2011). Somit wäre Upd3 nicht nur mit der EZM, sondern auch mit der Zellmembran assoziiert. Andererseits besteht auch die Möglichkeit, dass sich das Heparin an die Zellen anlagert, somit einige Bindungsstellen für die Antikörper blockiert und die Fluoreszenzintensität der Zellen dadurch verringert wird. Eine weitere Möglichkeit der Membranassoziation wäre, dass Upd3 als Transmembranprotein translatiert wird, welches mit einem Lipidanker modifiziert wird. Das Vorhandensein eines GPI-Ankers ist jedoch auszuschließen, da GPI-Anker mit dem C-Terminus des Proteins verbunden sind. Am C-

terminalen Ende befand sich bei diesem Konstrukt jedoch der GFP-tag. Bei der Sekretion sowie der Abspaltung eines Typ-II-Transmembranproteins wird ein N-terminaler Teil des Proteins abgespalten.

Um die Hypothese zu untermauern, dass Upd3 sowohl Membran-assoziiert als auch als Transmembranprotein vorliegt, wurden extrahierte Membranen von Upd3-transfizierten HEK-293T-Zellen mit einem stark basischen Puffer gewaschen. Wodurch Membran-assoziierte, jedoch nicht Lipid-verankerte Proteine von der Membran gelöst werden. Entsprechend der Hypothese konnte Upd3 durch seinen N-terminalen *HA-tag* zum größten Teil in den Membranfraktionen nachgewiesen werden. Dementsprechend wurde der *tag* nicht abgeschnitten. Dass auch die lösliche Fraktion das Protein mit diesem *tag* enthielt, schien ein Problem der Versuchsdurchführung zu sein, da bei der Positivkontrolle für ein weiteres Transmembranprotein (Limp-2) ebenfalls im Überstand das Protein durch den *HA-tag* detektiert wurde. Die Ergebnisse der Membranisolierung von Limp-2-transfizierten Zellen ähnelten denen der Upd3-transfizierten Zellen. Interessanterweise konnte auch bei der Membranpräparation von Upd3-transfizierten Drosophilazellen Upd3 sowohl im Membransediment und im Überstand detektiert werden. Allerdings wurde hier mehr Upd3 im Überstand detektiert als in den Membranen (Daten nicht gezeigt). Da dieser Versuch jedoch nur einmal durchgeführt wurde, ist für eine aussagekräftige Quantifizierung eine entsprechende Wiederholung des Versuches erforderlich, um verlässliche Rückschlüsse daraus ziehen zu können. Dessen ungeachtet konnte sowohl in einer humanen, sowie in einer Insektenzelllinie Upd3 als Transmembranprotein nachgewiesen werden. Zusammen mit den Befunden, dass sich das Zytokin-ähnliche Protein teilweise durch die Zugabe von Heparin von der Zelle ablösen lässt, legt die Schlussfolgerung nahe, dass Upd3 als Transmembranprotein hergestellt wird, welches im Laufe seiner Lebensdauer prozessiert wird. Dadurch wird Upd3 löslich, assoziiert aber aufgrund seiner positiven Ladung mit Glykosaminoglykanen. Offen bleibt die Frage, wie und wo das Protein prozessiert und von der Membran freigesetzt wird. Möglicherweise spielt hier eine Protease, ähnlich der Metalloproteasen beim Menschen, eine entscheidende Rolle.

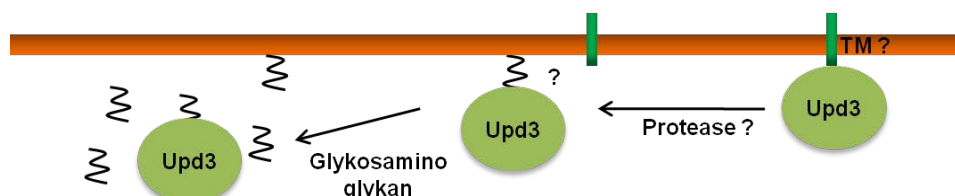


Abbildung 30: Hypothetischer Weg von Upd3 vom Transmembranprotein zum löslichen Protein. Upd3 könnte als Transmembranprotein exprimiert und durch eine Protease abgespalten werden. Danach könnte das Protein durch Glykosaminoglykane mit der Zellmembran bzw. extrazellulären Matrix assoziiert sein. Durch freies Glykosaminoglykan, wie zum Beispiel Heparin, kann Upd3 von der Membran gelöst werden.

4.2 Funktionelle und Strukturelle Charakterisierung des rekombinanten Upd3

4.2.1 Herstellung des Trx-Upd3 für die Antikörperproduktion

Für die Strukturaufklärung und Antikörperproduktion wurde rekombinantes Upd3 hergestellt und gereinigt. Aufgrund der Strukturvorhersagen und der vorangegangenen Ergebnisse der Durchflusszytometrie und Membranisolierung wurde bei der Klonierung des Trx-Upd3-Konstrukts davon ausgegangen, dass es sich bei Upd3 um ein Transmembranprotein handelt. Hierbei würde der hydrophobe Abschnitt (Aminosäurerest 52-74) die Anker-Sequenz bzw. das Transmembransegment darstellen. Bei der Klonierung des Konstrukts wurde darauf geachtet, dass das rekombinante Protein weder den hydrophoben noch den intrazellulären Abschnitt beinhaltet. Es ist von Vorteil, aufgrund der Größe des Proteins, bei dem Konstrukt auf, für die Funktion vorerst nicht relevante Aminosäuren, zu verzichten, da besonders bei großen Proteinen die Problematik besteht, dass viele Signale in den NMR-Spektren überlappen. Neben dem potentiellen extrazellulären Bereich enthielt das verwendete Konstrukt zusätzlich einen Thioredoxin- und einen His-tag. Mit dem Thioredoxin-tag sollte eine höhere Ausbeute an löslichem Protein erzielt werden. Der His-tag diente der Reinigung mittels Affinitätschromatografie.

Trx-Upd3 konnte als lösliches Protein und in IBs exprimiert werden. Mit der Reinigung des löslichen Trx-Upd3 wurde begonnen, da es von Vorteil ist lösliches Protein zu reinigen. Hierbei wird ein geringerer Zeitaufwand gegenüber der Isolierung und Reinigung von IBs sowie der Renaturierung des denaturierten Proteins benötigt. Bei der Reinigung des löslichen Proteins befand sich in der Probe neben Trx-Upd3 eine große Menge DNA, die vermutlich stark mit dem Protein assoziiert. Möglicherweise waren die Upd3-Varianten an der Oberfläche stark positiv geladen, wodurch die negativ geladene DNA eine hohe Affinität zu dem Protein zeigte. Mit einem errechneten pI von 9.8 bei Trx-Upd3 und 10.6 bei His-Upd3 und einem Puffer mit einem pH-Wert von 7.4 schien dies eine logische Erklärung zu sein, da unter diesen Bedingungen beide Konstrukte eine positive Ladung besitzen. Dementsprechend blieb jeglicher Versuch die DNA zu entfernen erfolglos. Trx-Upd3 wurde demnach aus IBs gereinigt, wobei durch Inkubation der IBs mit Nuklease und anschließender Reinigung des Proteins mittels Affinitätschromatografie die DNA entfernt werden konnte. Demzufolge scheint die Bindung zwischen dem löslichem Upd3 und DNA stärker als die Bindung zwischen den IBs und DNA, sodass die Nuklease die DNA spalten konnte. Möglicherweise entstehen durch die natürliche Faltung des Zytokin-ähnlichen Proteins ein oder mehrere sehr kationische Bereiche, welche bei aggregiertem Upd3 nicht vorhanden sind. Die Anhäufung positiver Ladung könnte zu der erhöhten Affinität des nativen

Proteins zur DNA führen. Dies käme der Tatsache gleich, dass Upd3 als Glykosaminykkan bindendes Protein beschrieben wurde (Wright, Vogt et al. 2011). Gereinigtes Trx-Upd3 wurde für die Produktion von den Antikörpern U31-1, U31-4 und U31-7 verwendet, welche anschließend auf ihre Spezifität untersucht wurden. Die Untersuchungen ergaben, dass U31-4 Sequenz-spezifisch und U31-7 Konformations-spezifisch ist. U31-4 konnte ein kleineres Konstrukt von Upd3 nicht auf einem Western Blot detektieren. Diesem Konstrukt fehlten einige Aminosäuren am N- und C-Terminus im Vergleich zu His-Upd3 (Abbildung 31). Daraus ließ sich schließen, dass der Antikörper U31-4 gegen einen Sequenzabschnitt am C- oder N-Terminus gerichtet war. Durch die Produktion der Antikörper kann nun Upd3 ohne *tag* detektiert werden. Somit kann unter anderem untersucht werden, ob Upd3 ein Transmembranprotein ist. Mittels Durchflusszytometrie kann gezeigt werden, ob Upd3 durch Trypsin von der Zelloberfläche gespalten wird. Somit ist sichergestellt, dass nicht möglicherweise der GFP-*tag* von dem Fusionsprotein gespalten wurde, sondern Upd3 von der Membran. In Untersuchungen mittels Immunfluoreszenz kann der Antikörper U31-7 endogenes Upd3 detektieren. Dadurch kann die Expression von Upd3 in vivo untersucht werden. Auch bei der Untersuchung ob Upd3 direkt an Domeless bindet, ist ein Antikörper gegen Upd3 von Vorteil. Hierfür kann bei einem *pull down*-Experiment Upd3 ohne *tag* und Domeless mit einem His-*tag* verwendet werden.

Da für die Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie Trx-Upd3 zu groß ist und sich die Linien verbreitern würden, sollte der Trx-*tag* von dem Fusionsprotein entfernt werden. Die Ausbeute nach der Abspaltung des Trx-*tags* von Trx-Upd3 war jedoch zu gering. Die Abspaltung von Thioredoxin würde neben einer Verringerung der Linienbreite zu einer Abnahme der Signale im Spektrum führen. Demnach wurde für die Strukturaufklärung Upd3 nur mit N-terminalem His-*tag* und ohne Trx-*tag* hergestellt. Da der His-*tag* wegen seiner Flexibilität und seiner geringen Größe keinen negativen Einfluss auf die Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie hat, konnte das Protein direkt nach der Reinigung strukturell analysiert werden.

4.2.2 Luciferase-Test

Mittels Luciferase-Test wurde die biologische Aktivität von Trx-Upd3 und His-Upd3 überprüft. Dabei wurde gezeigt, dass beide Konstrukte aktiv waren, wobei His-Upd3 eine höhere Aktivität aufwies als Trx-Upd3. Möglicherweise lag dies an der hohen Konzentration des eingesetzten Trx-Upd3 (2.4 μM). Von IL-6 ist bekannt, dass die Aktivität nach Überschreiten einer bestimmten Konzentration abnimmt (van Dam, Mullberg et al. 1993). Bei dem anschließenden Versuch mit aufsteigender Proteinkonzentration von His-Upd3 konnte bei

der höchsten Konzentration (1.6 μM) ebenfalls eine Abnahme der Aktivität gemessen werden. Mit geringeren Konzentrationen konnte jedoch ein Anstieg der Aktivität proportional zu der Konzentration von His-Upd3 gemessen werden. Möglicherweise hat der *tag* einen Einfluss auf die Aktivität. Demnach könnte der Trx-*tag* die Bindung des Upd3 an seinen Rezeptor negativ beeinflussen. Da der His-*tag* kleiner ist als der Trx-*tag*, hat dieser scheinbar keinen bzw. einen geringeren Einfluss auf die Bindung und His-Upd3 damit eine höhere Aktivität. Ob die Bindung oder die Aktivierung von Domeless gestört wird ist genauso wenig geklärt wie die Frage, ob der His-*tag* an sich störend wirkt. Hierfür müsste Upd3 ohne N-terminalen *tag* hergestellt werden, bzw. der His-*tag* proteolytisch abgespalten werden.

Diese Experimente lassen jedoch die Aussage zu, dass der vorhergesagte extrazelluläre Bereich von Upd3 ausreichend ist, um die Jak/Stat-Signalkaskade in Drosophilazellen zu aktivieren. Somit ist die Strukturaufklärung des extrazellulären Bereichs von Upd3 von besonderem Interesse.

4.2.3 Strukturelle Charakterisierung des His-Upd3

Die Sekundärstrukturvorhersagen von Upd3 ergaben ein rein α -helikales Protein. Diese Vorhersage konnte mittels Zirkulardichroismus für His-Upd3 bestätigt werden. Durch die Erstellung einer Schmelzkurve konnte gezeigt werden, dass das gefaltete Protein durch Hitze denaturiert werden kann. Die Tatsache, dass His-Upd3 bei etwa 37 °C zu denaturieren begann deutet daraufhin, dass das Protein thermolabil ist. Jedoch ließ sich das erhitzte His-Upd3 durch Abkühlung wieder renaturieren, die Denaturierung war also reversibel.

Upd3 zeigt keine Sequenzhomologie zu IL-6, allerdings könnte seine Funktion in der Immunantwort und die α -helikale Struktur ein Hinweis auf eine Verwandtschaft von Upd3 mit IL-6 sein. Upd3 aktiviert unter anderem die Expression des Akute-Phase-Protein TotA (Agaisse, Petersen et al. 2003) und spielt demnach eine Rolle bei Immunreaktionen in *Drosophila*, vergleichbar mit IL-6 in den Vertebraten. Die Verwandtschaft von Domeless mit den IL-6-Familie-Rezeptoren wurde bereits beschrieben (Brown, Hu et al. 2001; Chen, Chen et al. 2002; Makki, Meister et al. 2010). Die Verbindung von Upd3 zu IL-6 ist von großem Interesse, da Upd3 der Aktivator eines vereinfachten IL-6-Signalwegs ohne IL-6 Rezeptor sein könnte, wobei noch nicht beschrieben wurde, ob die Bindung zwischen Upd3 und Domeless ohne α -Rezeptor/Korezeptor abläuft (Abbildung 30). Es wäre demnach interessant zu untersuchen, ob zwischen Domeless und Upd3 eine direkte Bindung vorliegt oder ob beide Proteine mittels eines Korezeptors interagieren. Falls Upd3 ein Transmembranprotein ist, würde dieses Protein möglicherweise eine evolutionäre Verknüpfung zwischen IL-6 und dem IL-6R α darstellen. Upd3 könnte demnach die Funktion beider Proteine als vereinfachte Form des Signalweges vereinen. Eventuell könnte lösliches Upd3, zusätzlich zur Spaltung

des Transmembranproteins, durch alternatives Spleißen entstehen. Diese Vermutungen sind allerdings Spekulationen und erfordern weitere Untersuchungen.

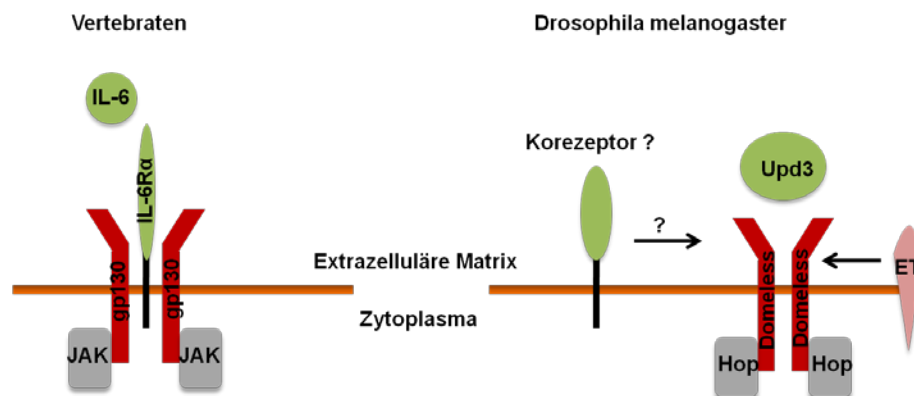


Abbildung 31: Direkter Vergleich der Ligand-Rezeptor-Interaktion des Jak/Stat-Signalweges in Vertebraten und in *Drosophila*. Dargestellt sind Liganden, Rezeptoren und Januskinasen. Proteine, deren Beteiligung hypothetisch ist und noch nicht bewiesen wurde, sind mit einem Fragezeichen markiert. ET (*eye transformer*) ist ein Transmembranprotein und wurde als Inhibitor des Jak/Stat-Signalweges beschrieben (Kallio, Myllymaki et al. 2010).

Upd3 besitzt fünf Cysteine. Da das rekombinant exprimierte His-Upd3 nicht die komplette Aminosäuresequenz von Upd3 enthielt, fehlte diesem ein Cystein (Cys^{69}). Die massenspektrometrischen Untersuchungen von His-Upd3 ergaben, dass das N-Terminal gelegene Cystein (Cys^{129}) mit dem C-Terminal gelegenen Cystein (Cys^{387}) durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden war. Die zwei verbleibenden Cysteine lagen in ihrer reduzierten Form vor. Diese Ergebnisse wurden durch die Reinigung eines Upd3-Konstrukts bestätigt, bei dem die beiden N- und C-Terminal gelegenen Cysteine fehlten (Abbildung 31). Bei diesem Protein war eine Rückfaltung erfolglos, da das Protein präzipitierte (Daten nicht gezeigt). Womöglich fehlte die besagte Cys^{129} - Cys^{387} -Disulfidbindung für die Stabilisierung der korrekten Faltung. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die weiteren Aminosäurereste, die bei diesem Konstrukt entfernt wurden, ebenfalls für die Faltung essentiell sind. Aus diesen Ergebnissen kann man schlussfolgern, dass im ursprünglichen Upd3 Cys^{129} und Cys^{387} über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Allerdings bleibt die Frage offen, ob Cys^{146} oder Cys^{271} mit Cys^{69} verknüpft ist, da dieses Cystein in dem gereinigten His-Upd3 fehlte, jedoch vor der vorhergesagten transmembranen Helix liegt.

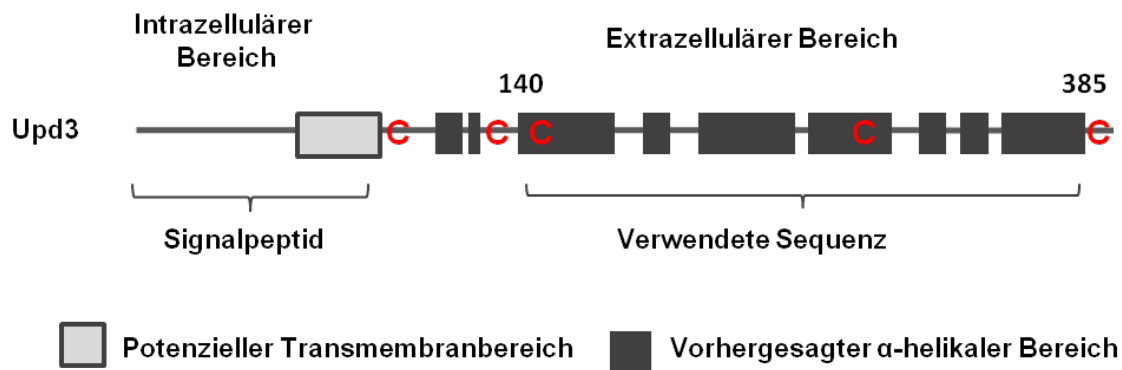


Abbildung 32: Schematische Darstellung von Upd3 mit der verwendeten Sequenz für die Klonierung eines kürzeren Konstrukts als Trx-Upd3 und His-Upd3. Die Sequenz wurde in den Vektor pET-28a kloniert. Die Cysteine des Upd3 sind mit einem roten C gekennzeichnet. Das exprimierte Protein enthielt demnach einen His-tag und den vorhergesagten extrazellulären Bereich von Upd3 von Aminosäure 140 bis 385 inklusive zwei Cysteine. Dieses Upd3-Konstrukt ließ sich nicht rückfalten und wurde nicht von dem Upd3 spezifischen Antikörper U31-4 detektiert.

Nachdem mittels Zirkulardichroismus (CD) und DLS gezeigt wurde, dass His-Upd3 in 50 mM NaOAc (pH 5.0) als gefaltetes Protein vorliegt und die Lösung monodispers ist, konnte mit den NMR-Messungen begonnen werden. Da die Untersuchungen mittels CD-Spektrometrie und DLS unter denselben Pufferbedingungen wie die NMR-Messungen erfolgten, wurde vorausgesetzt, dass His-Upd3 auch bei den NMR-Messungen als lösliches und korrekt gefaltetes Protein vorlag. His-Upd3 konnte erfolgreich mit ^{13}C - und ^{15}N -Isotopen markiert und gereinigt werden. Der Puffer (20 mM Tris, pH 8.0, 500 mM NaCl) in dem His-Upd3 renaturiert und mittels Größenausschlusschromatografie gereinigt wurde, eignete sich wegen der hohen Ionenkonzentration nicht für eine NMR-Messung. Als geeigneter Puffer für die NMR-Messung von His-Upd3 erwies sich 50 mM NaOAc (pH 5). His-Upd3 besitzt in einem sauren Puffer anscheinend eine hohe Affinität zur Säulenmatrix. Auf Grund dessen wurde His-Upd3 erst in 20 mM Tris (pH 8.0) und 500 mM NaCl mittels Größenausschlusschromatografie gereinigt und der Puffer anschließend ausgetauscht.

Aufgrund der geringen Dispersion der Resonanzen zeigte das aufgenommene ^{15}N -HSQC-Spektrum, dass mittels des doppelt markierten Proteins keine Aufklärung der Struktur von His-Upd3 erfolgen kann. Mit der Größe von 38 kDa und seiner α -helikalen Struktur war das gereinigte His-Upd3 zu groß, um ein auswertbares NMR-Spektrum zu erhalten. Dennoch konnte mit dieser ersten Messung gezeigt werden, dass His-Upd3 gefaltet und stabil war, und dass Signale detektiert werden konnten. Der nächste Schritt wäre nun die Aminosäurereste-spezifische Isotopen-Markierung. Mittels dieser Methode können die Signale der verschiedenen Aminosäuren in getrennten Messungen aufgenommen werden. Die Spektren der verschiedenen Aminosäuren können anschließend kombiniert werden. Die Aufklärung der Struktur wäre ein großer Schritt für die Untersuchungen des Jak/Stat-Signalweges von *Drosophila*, da dies erste Einblicke auf die Interaktion mit dem Rezeptor

Domeless geben könnte. Des Weiteren könnte die Strukturaufklärung von His-Upd3 Hinweise auf eine Verwandtschaft mit den IL-6-Familie Zytokinen liefern.

5 Aussichten

Um die Hypothese, welche besagt, dass Upd3 ein Transmembranprotein ist, eindeutig bestätigen zu können, sind weitere Versuche mittels Durchflusszytometrie notwendig. Für den Versuch, bei dem die HA-Upd3-GFP-transfizierten Zellen mit Trypsin inkubiert wurden, könnte Upd3 ohne *tag* verwendet werden, welches durch den α -Upd3-Ak detektiert wird. Hierdurch könnte die Möglichkeit ausgeschlossen werden, dass Trypsin nur den GFP-*tag* abspaltet. Eine verringerte Fluoreszenz der Zellen nach der Inkubation mit Trypsin würde bedeuten, dass Upd3 abgespalten wurde.

Für die Membranisolierung wäre eine Positivkontrolle für ein membranassoziiertes Protein hilfreich. Es könnte überprüft werden, wie sich solch ein Protein bei der Membranisolierung verhält. Eine weitere Möglichkeit herauszufinden, ob Upd3 ein Transmembranprotein ist, wäre die N-terminale Sequenzierung von Upd3. Wenn Drosophilazellen mit einem *full length* Upd3-Konstrukt transfiziert werden, und das sich im Überstand befindliche Upd3 N-terminal sequenziert wird, wäre zu erkennen, ob die Signalsequenz im Verlauf der Reifung abgeschnitten wurde oder ob Upd3 durch eine Protease nach dem Transmembranbereich von der Membran abgetrennt wurde. Das Protein würde, nach der Vorhersage von „PrediSi“, ab der 66. AS beginnen. Würde Upd3 nach der Transmembranregion geschnitten, würde es ab der 70. - 93. AS beginnen. Bei der Expression von Upd3 in Drosophilazellen konnte bisher nie ausreichend sekretorisches Protein für eine Sequenzierung gewonnen werden. Nachdem bewiesen wurde, dass Upd3 auch als Transmembranprotein vorkommt, wäre es sehr interessant zu untersuchen, ob Upd3 kontrolliert gespalten wird (*shedding*). Falls Upd3 durch eine Protease von der Membran abgespalten wird, wäre der nächste Schritt diese zu identifizieren.

In dieser Arbeit ist es gelungen ein Reinigungsprotokoll für den vorhergesagten extrazellulären Teil von Upd3 zu erstellen. Die Struktur von His-Upd3 könnte nach einer Aminosäurereste-spezifischen Markierung mittels NMR-Spektroskopie gelöst werden.

Des Weiteren wurde die direkte Bindung zwischen Domeless und Upd3 *in vitro* untersucht. In dieser Arbeit konnte weder mittels eines *pull down*-Experiments noch durch Plasmon Resonanz Versuche eine direkte Bindung detektiert werden. Bei den *pull down*-Versuchen bestand jedoch das Problem der unspezifischen Bindung. Hier wären weitere Versuche mit anderen Konstrukten notwendig. Zu Beginn wurde Domeless, fusioniert mit dem FC-Teil von IgG, verwendet. Es stellte sich jedoch als instabil heraus. Ein neues Domeless-Konstrukt mit His-*tag* wurde erstellt und konnte in HEK-293T-Zellen exprimiert werden. Mit diesem

Konstrukt sind neue Versuche durchzuführen. Es besteht die Möglichkeit, dass bei der Interaktion zwischen Upd3 und Domeless ein Korezeptor oder andere Proteine, wie *eye transformer* (ET) eine Rolle spielen (Kallio, Myllymaki et al. 2010).

6 Literatur

- Agaisse, H., U. M. Petersen, et al. (2003). "Signaling role of hemocytes in *Drosophila* JAK/STAT-dependent response to septic injury." Developmental Cell 5(3): 441-450.
- Almen, M. S., K. J. Nordstrom, et al. (2009). "Mapping the human membrane proteome: a majority of the human membrane proteins can be classified according to function and evolutionary origin." BMC biology 7: 50.
- Andus, T., T. Geiger, et al. (1987). "Recombinant human B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IFN-beta 2) regulates beta-fibrinogen and albumin mRNA levels in Fao-9 cells." FEBS letters 221(1): 18-22.
- Argos, P., J. K. Rao, et al. (1982). "Structural prediction of membrane-bound proteins." European journal of biochemistry / FEBS 128(2-3): 565-575.
- Baeg, G. H., R. Zhou, et al. (2005). "Genome-wide RNAi analysis of JAK/STAT signaling components in *Drosophila*." Genes & Development 19(16): 1861-1870.
- Binari, R. and N. Perrimon (1994). "Stripe-Specific Regulation of Pair-Rule Genes by Hopscotch, a Putative Jak Family Tyrosine Kinase in *Drosophila*." Genes & Development 8(3): 300-312.
- Blobel, G. and B. Dobberstein (1975). "Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma." The Journal of cell biology 67(3): 835-851.
- Brown, S., N. Hu, et al. (2001). "Identification of the first invertebrate interleukin JAK/STAT receptor, the *Drosophila* gene *domeless*." Curr Biol 11(21): 1700-1705.
- Buchon, N., N. A. Broderick, et al. (2009). "*Drosophila* intestinal response to bacterial infection: activation of host defense and stem cell proliferation." Cell Host & Microbe 5(2): 200-211.
- Bulet, P., C. Hetru, et al. (1999). "Antimicrobial peptides in insects; structure and function." Developmental and comparative immunology 23(4-5): 329-344.
- Capaldi, R. A. and D. E. Green (1972). "Membrane proteins and membrane structure." FEBS letters 25(2): 205-209.
- Chen, H. W., X. Chen, et al. (2002). "mom identifies a receptor for the *Drosophila* JAK/STAT signal transduction pathway and encodes a protein distantly related to the mammalian cytokine receptor family." Genes Dev 16(3): 388-398.
- Cherbas, L., A. Willingham, et al. (2011). "The transcriptional diversity of 25 *Drosophila* cell lines." Genome research 21(2): 301-314.
- Dalbey, R. E. and G. Von Heijne (1992). "Signal peptidases in prokaryotes and eukaryotes--a new protease family." Trends in biochemical sciences 17(11): 474-478.
- Darnell, J. E., Jr., I. M. Kerr, et al. (1994). "Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins." Science 264(5164): 1415-1421.
- Dearolf, C. R. (1999). "JAKs and STATs in invertebrate model organisms." Cell Mol Life Sci 55(12): 1578-1584.
- Ferrandon, D., J. L. Imler, et al. (2004). "Sensing infection in *Drosophila*: Toll and beyond." Seminars in immunology 16(1): 43-53.
- Gauldie, J., C. Richards, et al. (1987). "Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 84(20): 7251-7255.
- Ghiglione, C., O. Devergne, et al. (2002). "The *Drosophila* cytokine receptor *Domeless* controls border cell migration and epithelial polarization during oogenesis." Development 129(23): 5437-5447.
- Grötzinger, J., T. Kernebeck, et al. (1999). "IL-6 type cytokine receptor complexes: hexamer, tetramer or both?" Biological chemistry 380(7-8): 803-813.

- Harrison, D. A., R. Binari, et al. (1995). "Activation of a Drosophila Janus kinase (JAK) causes hematopoietic neoplasia and developmental defects." Embo Journal 14(12): 2857-2865.
- Harrison, D. A., P. E. McCoon, et al. (1998). "Drosophila unpaired encodes a secreted protein that activates the JAK signaling pathway." Genes & Development 12(20): 3252-3263.
- Heijne, G. (1986). "The distribution of positively charged residues in bacterial inner membrane proteins correlates with the trans-membrane topology." The EMBO journal 5(11): 3021-3027.
- Heinrich, P. C., I. Behrmann, et al. (2003). "Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation." The Biochemical journal 374(Pt 1): 1-20.
- Hoffmann, J. A. (1995). "Innate immunity of insects." Current opinion in immunology 7(1): 4-10.
- Hoffmann, J. A. (2003). "The immune response of Drosophila." Nature 426(6962): 33-38.
- Hombria, J. C., S. Brown, et al. (2005). "Characterisation of Upd2, a Drosophila JAK/STAT pathway ligand." Dev Biol 288(2): 420-433.
- Hou, X. S., M. B. Melnick, et al. (1996). "marelle Acts downstream of the Drosophila HOP/JAK kinase and encodes a protein similar to the mammalian STATs (vol 84, pg 411, 1996)." Cell 85(2): U15-U15.
- Jiang, H., P. H. Patel, et al. (2009). "Cytokine/Jak/Stat signaling mediates regeneration and homeostasis in the Drosophila midgut." Cell 137(7): 1343-1355.
- Kallio, J., H. Myllymaki, et al. (2010). "Eye transformer is a negative regulator of Drosophila JAK/STAT signaling." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 24(11): 4467-4479.
- Kawano, M., T. Hirano, et al. (1988). "Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas." Nature 332(6159): 83-85.
- Kearney, J. F., A. Radbruch, et al. (1979). "A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines." Journal of immunology 123(4): 1548-1550.
- Kiger, A. A., D. L. Jones, et al. (2001). "Stem cell self-renewal specified by JAK-STAT activation in response to a support cell cue." Science 294(5551): 2542-2545.
- Kilic, A., S. Klose, et al. (2010). "The Drosophila Crumbs signal peptide is unusually long and is a substrate for signal peptide peptidase." European journal of cell biology 89(6): 449-461.
- Kishimoto, T., S. Akira, et al. (1995). "Interleukin-6 family of cytokines and gp130." Blood 86(4): 1243-1254.
- Krogh, A., B. Larsson, et al. (2001). "Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes." Journal of molecular biology 305(3): 567-580.
- Lemaitre, B., E. Nicolas, et al. (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults." Cell 86(6): 973-983.
- Low, M. G. and A. R. Saltiel (1988). "Structural and Functional Roles of Glycosyl-Phosphatidylinositol in Membranes." Science 239(4837): 268-275.
- Lu, J. Y. and S. L. Hofmann (2006). "Lysosomal metabolism of lipid-modified proteins." Journal of Lipid Research 47(7): 1352-1357.
- Mackiewicz, A., H. Schooltink, et al. (1992). "Complex of soluble human IL-6-receptor/IL-6 up-regulates expression of acute-phase proteins." Journal of immunology 149(6): 2021-2027.
- Makki, R., M. Meister, et al. (2010). "A short receptor downregulates JAK/STAT signalling to control the Drosophila cellular immune response." PLoS biology 8(8): e1000441.
- Martoglio, B. and B. Dobberstein (1998). "Signal sequences: more than just greasy peptides." Trends in cell biology 8(10): 410-415.
- Milstein, C. (1999). "The hybridoma revolution: an offshoot of basic research." BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology 21(11): 966-973.
- Mukherjee, T., J. C. Hombria, et al. (2005). "Opposing roles for Drosophila JAK/STAT signalling during cellular proliferation." Oncogene 24(15): 2503-2511.

- Okada, M., N. Sakaguchi, et al. (1983). "B cell growth factors and B cell differentiation factor from human T hybridomas. Two distinct kinds of B cell growth factor and their synergism in B cell proliferation." The Journal of experimental medicine 157(2): 583-590.
- Reczek, D., M. Schwake, et al. (2007). "LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase." Cell 131(4): 770-783.
- Rose-John, S., J. Scheller, et al. (2006). "Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer." Journal of leukocyte biology 80(2): 227-236.
- Saftig, P., B. Schröder, et al. (2010). "Lysosomal membrane proteins: life between acid and neutral conditions." Biochemical Society transactions 38(6): 1420-1423.
- Scheller, J. and S. Rose-John (2006). "Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside." Medical microbiology and immunology 195(4): 173-183.
- Schindler, C. and J. E. Darnell, Jr. (1995). "Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway." Annu Rev Biochem 64: 621-651.
- van Dam, M., J. Mullberg, et al. (1993). "Structure-function analysis of interleukin-6 utilizing human/murine chimeric molecules. Involvement of two separate domains in receptor binding." The Journal of biological chemistry 268(20): 15285-15290.
- Van Damme, J., G. Opdenakker, et al. (1987). "Identification of the human 26-kD protein, interferon beta 2 (IFN-beta 2), as a B cell hybridoma/plasmacytoma growth factor induced by interleukin 1 and tumor necrosis factor." The Journal of experimental medicine 165(3): 914-919.
- von Heijne, G. (1985). "Signal sequences. The limits of variation." Journal of molecular biology 184(1): 99-105.
- von Heijne, G. (1992). "Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule." Journal of molecular biology 225(2): 487-494.
- Wahlberg, J. M. and M. Spiess (1997). "Multiple determinants direct the orientation of signal-anchor proteins: the topogenic role of the hydrophobic signal domain." The Journal of cell biology 137(3): 555-562.
- Wright, V. M., K. L. Vogt, et al. (2011). "Differential activities of the Drosophila JAK/STAT pathway ligands Upd, Upd2 and Upd3." Cellular Signalling 23(5): 920-927.
- Zeidler, M. P., E. A. Bach, et al. (2000). "The roles of the Drosophila JAK/STAT pathway." Oncogene 19(21): 2598-2606.
- Zeidler, M. P., N. Perrimon, et al. (1999). "Polarity determination in the Drosophila eye: a novel role for unpaired and JAK/STAT signaling." Genes Dev 13(10): 1342-1353.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

μ	mikro
AAP	Agaroseauftragspuffer
Amp	Ampicillin
AMP	Antimikrobielle Peptide
AP	Alkaline Phosphatase
APC	Allophycocyanin
AS	Aminosäure
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonukleinsäure
dNTP	Desoxinukleotidtriphosphat
Dome	Domeless
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EK	Enterokinase
ER	Endoplasmatisches retikulum
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	<i>fetal calv serum</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
gp130	Glykoprotein 130
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
HA	Hemagglutinin
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
His	Histidin
Hop	Hopscotch
HSQC	<i>heteronuclear-single quantum coherence</i>
IBs	<i>inclusion bodies</i> (Einschlusskörperchen)
IL	Interleukin
IL-6Rα	Interleukin-6 Rezeptor alpha
IMD	<i>immune deficiency</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid

Jak	Januskinase
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LAP	Lämmli-Auftragspuffer
LB	<i>lysogeny broth</i>
Limp-2	<i>Lysosomal integrated membrane protein-2</i>
M	Molar
m	milli
min	Minute
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
n	nano
NaCl	Natriumchlorid
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
nm	Nanometer
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	R-Phycoerythrin
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RPMI	<i>rounds per minute</i>
s	Sekunde
S2	Schneider 2
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
Stat	<i>signal transducer and activator</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borsäure/EDTA
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TM	transmembran
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
TotA	Protein Turandot A
TROSY	<i>transverse relaxation optimized</i>

	<i>spectroscopy</i>
Trx	Thioredoxin
U	<i>units</i> (Einheiten)
Upd	<i>unpaired</i>
UV	ultraviolet
V	Volt
wt	wildtyp

7.2 Aminosäuren

A (Ala)	Alanin
C (Cys)	Cystein
D (Asp)	Asparaginsäure
E (Glu)	Glutaminsäure
F (Phe)	Phenylalanin
G (Gly)	Glycin
H (His)	Histidin
I (Ile)	Isoleucin
K (Lys)	Lysin
L (Leu)	Leucin
M (Met)	Methionin
N (Asn)	Asparagin
P (Pro)	Prolin
Q (Gln)	Glutamin
R (Arg)	Arginin
S (Ser)	Serin
T (Thr)	Threonin
V (Val)	Valin
W (Trp)	Tryptophan
Y (Tyr)	Tyrosin

7.3 DNA für das rekombinante Upd3

7.3.1.1 Vektorkarten

pET-32a-c(+) Vectors

TB122 12/98

	Cat. No.
pET-32a DNA	69015-3
pET-32b DNA	69016-3
pET-32c DNA	69017-3

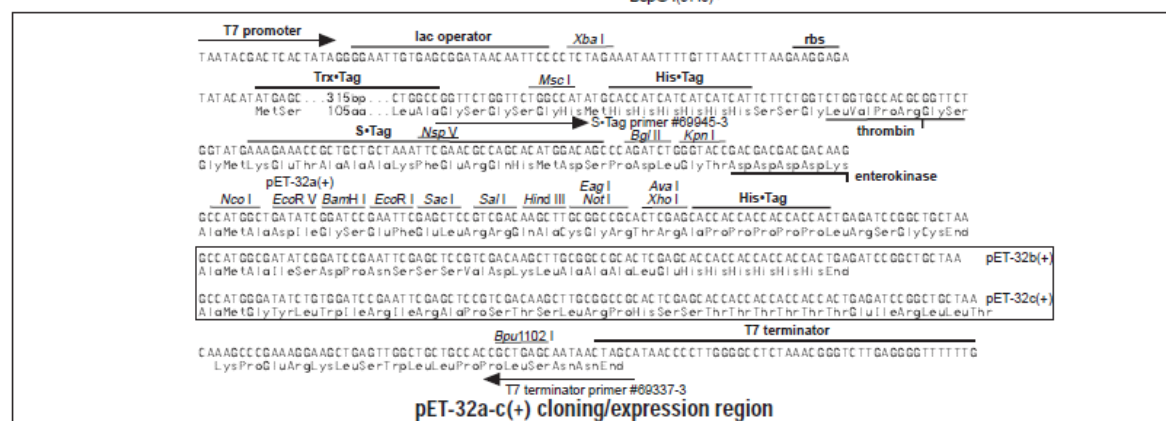
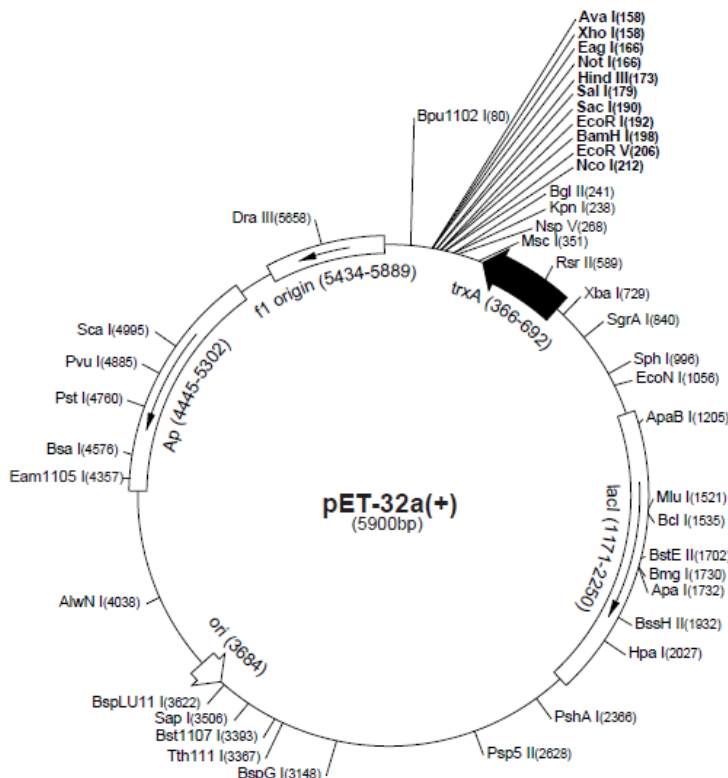
The pET-32 series is designed for cloning and high-level expression of peptide sequences fused with the 109aa Trx•Tag™ thioredoxin protein (1). Cloning sites are available for producing fusion proteins also containing cleavable His•Tag® and S•Tag™ sequences for detection and purification. Unique sites are shown on the circle map. Note that the sequence is numbered by the pBR322 convention, so the T7 expression region is reversed on the circle map. The cloning/expression region of the coding strand transcribed by T7 RNA polymerase is shown below. The f1 origin is oriented so that infection with helper phage will produce virions containing single-stranded DNA that corresponds to the coding strand. Therefore, single-stranded sequencing should be performed using the T7 terminator primer (Cat. No. 69337-3).

1. LaVallie, E.R., DiBlasio, E.A., Kovacic, S., Grant, K.L., Schendel, P.F. and McCoy, J.M. (1993) *BioTechnology* 11, 187-193.

pET-32a(+) sequence landmarks

T7 promoter	764-780
T7 transcription start	763
Trx•Tag coding sequence	366-692
His•Tag coding sequence	327-344
S•Tag coding sequence	249-293
Multiple cloning sites	
(Nco I - Xho I)	158-217
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
lacI coding sequence	1171-2250
pBR322 origin	3684
bla coding sequence	4445-5302
f1 origin	5434-5889

The maps for pET-32b(+) and pET-32c(+) are the same as pET-32a(+) (shown) with the following exceptions: pET-32b(+) is a 5899bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*HI at 198. pET-32c(+) is a 5901bp plasmid; add 1bp to each site beyond *Bam*HI at 198 except for *Eco*R V, which cuts at 209.



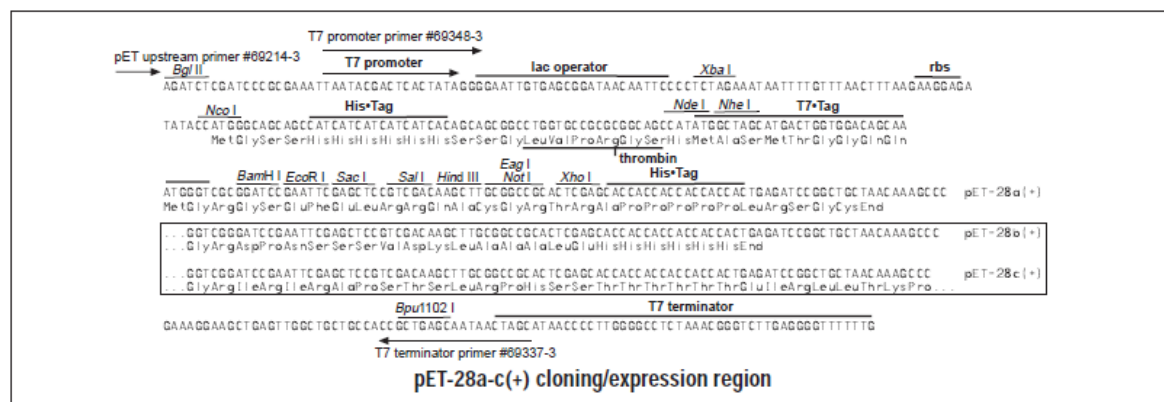
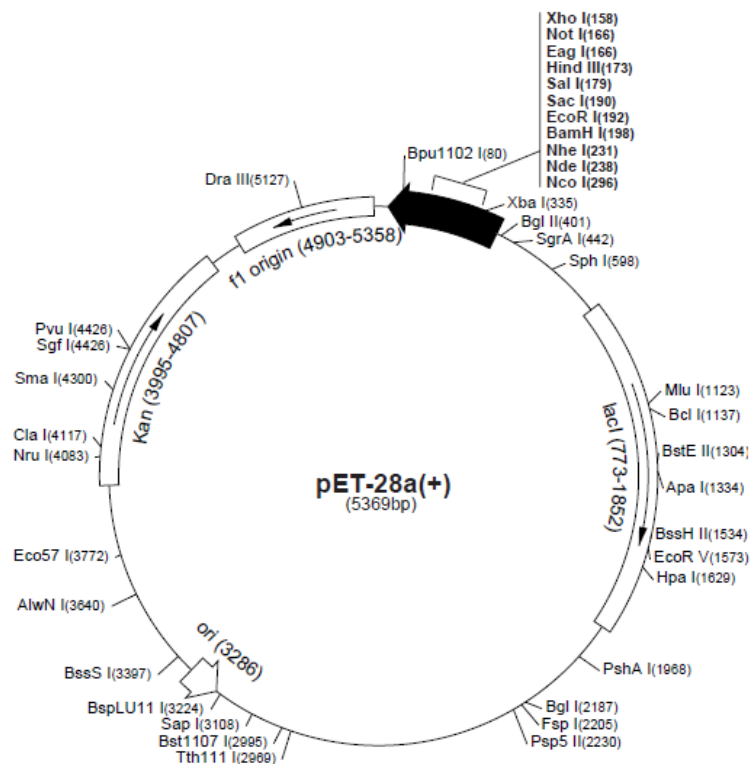
	Cat. No.
pET-28a DNA	69864-3
pET-28b DNA	69865-3
pET-28c DNA	69866-3

The pET-28a-c(+) vectors carry an N-terminal His⁶-Tag[®]/thrombin/T7-Tag[®] configuration plus an optional C-terminal His⁶-Tag sequence. Unique sites are shown on the circle map. Note that the sequence is numbered by the pBR322 convention, so the T7 expression region is reversed on the circular map. The cloning/expression region of the coding strand transcribed by T7 RNA polymerase is shown below. The f1 origin is oriented so that infection with helper phage will produce virions containing single-stranded DNA that corresponds to the coding strand. Therefore, single-stranded sequencing should be performed using the T7 terminator primer (Cat. No. 69337-3).

pET-28a(+) sequence landmarks

T7 promoter	370-386
T7 transcription start	369
His•Tag coding sequence	270-287
T7•Tag coding sequence	207-239
Multiple cloning sites (<i>Bam</i> HI - <i>Xho</i> I)	158-203
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lacI</i> coding sequence	773-1852
pBR322 origin	3286
Kan coding sequence	3995-4807
f1 origin	4903-5358

The maps for pET-28b(+) and pET-28c(+) are the same as pET-28a(+) (shown) with the following exceptions: pET-28b(+) is a 5368bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*H I at 198. pET-28c(+) is a 5367bp plasmid; subtract 2bp from each site beyond *Bam*H I at 198.



7.3.1.2 Sequenzen

Upd3

MTTADRPLDV SRSSGSGSRS GNKTARTRNP VEPQPQPPFV DRRRRLNRNW SLILLALAMS
QFALSGGGCG VSAAPSHLAT PPTDSPSSPI NPTNPLKHLQ KRSRAANFRL TFQQKLNASS
THLDWENTCN LKPTGLNETH SKAKRCKKRQ RILQNLQNT GRELRGIAE DKARITTNAD
KLATVSTKTL DIVEKNKWRFL YKGNRFLPR LNLTSKQLNL RHAHRDLQIY VGAFTYMRNI
KLHWDLANLQ AKSVLSDELG RMRKSAREVL CSVEEAINLT NLLYTPNRQR APQPRGQKKR
RQAQPVVITYK ILPRKLMEKR LQQFNSTLVP LVELHQQATL AARGEDVPPP PDDLMLVEQH
ALFTKLKFVQ YLKSIRKILA NQRKSLCKAT THVPAIQKK L

Trx-Upd3

MSDKIIHLTD DSFDTDVLKA DGAILVDFWA EWCGPCKMIA PILDEIADEY QGKLTIVAKLN
IDQNPQTAPK YGIRGIPTLL LFKNGEVAAT KVGALSKGQL KEFLDANLAG SGSGHMHMHHH
HHSSGLVPRG SGMKETAAAK FERQHMDSPD LDDDDKGVSA APSHLATPPT DSPSSPINPT
NPLKHLQKRS RAANFRLTFQ QKLNASSTHL DWENTCNLKP TGLNETHSKA KRCKKRQRIL
QNLQNTGRE LRGIQAEDKA RITTNADKLA TVSTKTLDIV EKNKWRFYKG NYRFLPRLNL
TSKQLNLRHA HRDLQIYVGA FTYMRNIKLH WDLANLQAKS VLSDELGRMR KSAREVLCSV
EEAINLTNLL YTPNRQRAPQ PRGQKKRRQA QPVVITYKILP RKLMEKRLQQ FNSTLVPLVE
LHQQATLAAR GEDVPPPPDD LMVLEQHALF TKLKVFVQYLK SIRKILANQR KSLCKATTHV
PKAIQKKL

His-Upd3

MGSSHHHHHHH SSGLVPRGSH MTNPLKHLQK RSRAANFRLT FQQKLNASST HLDWENTCNL
KPTGLNETHS KAKRCKKRQR ILQNLQNTG RELRGIAED KARITTNADK LATVSTKTLTD
IVEKNKWRFY KGNRFLPRL NLTSKQLNLR HAHRDLQIYV GAFTYMRNIK LHWDLANLQA
KSVLSDELGR MRKSAREVLC SVEEAINLTN LLYTPNRQRA PQPRGQKKRR QAQPVVITYKI
LPRKLMEKRL QQFNSTLVPL VELHQQATLA ARGEDVPPPP DDLMLVEQHA LFTKLKFVQY
LKSIRKILAN QRKSLCKATT HVPKAIQKKL

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Jana Nowinski, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mithilfe der angegebenen Hilfsmittel und Quellen unter Anleitung meiner akademischen Lehrer unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlichen Praxis der deutschen Forschungsgemeinschaft angefertigt habe.

Diese Dissertation wurde bisher an keiner anderen Fakultät vorgelegt.

Des Weiteren erkläre ich, kein anderes Promotionsverfahren ohne Erfolg beendet zu haben und dass keine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades vorliegt.

Jana Nowinski

Danksagung

Als erstes möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Joachim Grötzinger für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Bereitstellung des Themas dieser Dissertation bedanken. Ebenso bedanke ich mich für seinen fachlichen Rat und die schnelle Korrektur dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Stefan Rose-John danke ich für die Aufnahme am Biochemischen Institut und die konstruktiven Diskussionen in den Seminaren und den Cluster „trouble-shooting“-Treffen.

Ich möchte mich auch bei Herrn Prof. Dr. Thomas Roeder für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Promotion bedanken.

Besonderen Dank gilt Dr. Inken Lorenzen für die intensive Betreuung meiner Doktorarbeit, die vielen Tipps und Denkanstöße und natürlich auch für die Korrekturen der Dissertation.

Danke auch an Dr. Sascha Jung, für die Denkanstöße und die Hilfe am CD-Spektrometer und die Tipps und Korrekturen für die Dissertation.

Außerdem bedanke ich mich für die kooperative Zusammenarbeit bei Herrn Prof. Dr. Frank Sönnichsen, Dr. Henning Fedders, Dr. Ahmad Trad und Dr. Chien-Wen Hung.

Fürs Korrektur lesen bedanke ich mich außerdem bei Anna Zaslowski, Mirja Oldefest, Nina Hedemann, Katharina Höbel und Anja Schillert.

Ich danke der AG Grötzinger für die nette Zusammenarbeit und die freundliche Atmosphäre. Vielen Dank an Britta, Jessi, Anna, Mimi, Nina, Stefan, Jule, Tim, Kathi, Inken, Sascha, Ahmad, Sina, Michelle, Jonas und die Ehemaligen Michel, Björn, Madlen Verena und Mohammad.

Zum Schluss möchte ich mich besonders herzlich bei meinen Eltern für ihren jahrelangen Rückhalt bedanken und dass sie meinen beruflichen Werdegang möglich gemacht haben.